

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske
dijagnostike**

Ljiljana Majić

**PROMJENE METABOLIZMA ŽELJEZA
U MOZGU I JETRI ŽENKI SPRAGUE
DAWLEY ŠTAKORA IZLOŽENIH
MASNOJ I SLATKOJ HRANI**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske
dijagnostike**

Ljiljana Majić

**PROMJENE METABOLIZMA ŽELJEZA
U MOZGU I JETRI ŽENKI SPRAGUE
DAWLEY ŠTAKORA IZLOŽENIH
MASNOJ I SLATKOJ HRANI**

Završni rad

Osijek, 2018

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 39 stranica i 17 slika.

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici Mariji Heffer što je vjerovala u mene, bodrila me i pokazala mi da je sve što sam mislila da je nemoguće – ipak moguće, ali samo ako ne odustaneš.

Zahvaljujem se Miloradu Zjaliću koji ovaj cijeli proces učinio zabavnim i poučnim. Puno sam naučila o Star Warsu, narodnoj i klasičnoj glazbi, stickersima, plesnim pokretima i random činjenicama, a ponešto i o tome kako se ponašati u labosu bez da si odsječeš prst ili prsneš kiselinu u oči. Nepochjenjive lekcije! Veliko hvala na strpljenju i podršci, bez tebe bi sve ovo bilo nemoguće!

Hvala mojoj obitelji na maksimalnoj podršci koju mi je pružila tijekom studija, a posebno hvala mojoj sestri koja mi je pokazala da mogu biti sve što želim i da je samo nebo granica!

Hvala mom dečku Mariju na svim lijepim trenucima i riječima podrške koji su mi dali snage da idem dalje. Hvala ti što si uvijek tu za mene!

Hvala i mojim curama Katarini i Doris. Kato, hvala što si uvijek bila katalizator dobrog raspoloženja i pozitive! Zorka, hvala što si bila stup razuma i logike u trenucima kada je to bilo potrebno!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Molekularni mehanizmi koji doprinose razvoju inzulinske rezistencije i staničnog oštećenja kod pretilosti	1
1.1.1 Pretilost kao rizični čimbenik za poremećaje metabolizma željeza.....	1
1.1.2 Dušikov oksid i inzulinska rezistencija.....	3
1.1.3 Djelovanje inzulina i inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 na fosforilaciju mikrotubulima pridruženih proteina i nastanak amiloidnih plakova	4
1.1.4 Pokazatelji oštećenja i pokušaja oporavka tkiva u dijabetesu tipa II.....	5
2.1 Antidijabetici	5
3.1 Animalni modeli pretilosti i predijabetesa.....	7
2. HIPOTEZA	9
3. CILJEVI	10
4. MATERIJALI I METODE	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Pokusne životinje.....	11
4.3. Metode	11
4.3.1. Metoda Perls-DAB (Prusko modriilo)	12
4.3.2. Određivanje amiloidnih plakova (Kongo crvenilo)	13
4.3.3. Određivanje transferina i pTau	13
4.3.4. Određivanje nNOS.....	14
4.3.5. Određivanje PCNA	14
5. REZULTATI.....	16
5.1. Nakupljanje željeza u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima ..	16
5.2. Nakupljanje željeza u stanicama jetre periferno i centralno kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima	17

5.3. Ekspresija transferinskih receptora u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidi-jabeticima	20
5.4. Ekspresija nNOS u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidi-jabeticima	21
5.5. Nakupljanje amiloida u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidi-jabeticima	22
5.6. Nakupljanje pTau u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidi-jabeticima	23
5.7. Ekspresija PCNA u stanicama jetre periferno i centralno kod ženki izloženih HFHSD i antidi-jabeticima	24
6. RASPRAVA.....	27
7. ZAKLJUČAK	31
8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY	33
10. LITERATURA.....	34
11. ŽIVOTOPIS	39

POPIS KRATICA

A β	amiloid- β
AMP	adenozin monofosfat
APP	amiloidni prekursorski protein
ARC	arkuatna jezgra
ATP	adenozin trifosfat
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index</i>)
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
DAB	diaminobenzidin
DMH	dorzomedijalna jezgra hipotalamusa
DPP-4	dipeptidil peptidaza 4
GLP-1	glukagonu sličan peptid 1 (engl. <i>Glucagon-Like Protein 1</i>)
GLUT	prijenosnik glukoze (engl. <i>Glucose transporter</i>)
HFHSD	dijeta bogata mastima i ugljikohidratima (engl. <i>High Fat High Sucrose Diet</i>)
HFHSD-M	obogaćena dijeta uz dodatak metformina
HFHSD-L	obogaćena dijeta uz dodatak liraglutida
IAPP	amiloidni polipeptid Langerhansovih otočića (engl. <i>Islet Amyloid Polypeptide</i>)
IDE	inzulin-degradirajući enzim
IGF-1	inzulinu-sličan čimbenik rasta 1 (engl. <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>)
IL-6	interleukin 6
IRS-2	supstrat inzulinskog receptora 2 (engl. <i>Insulin receptor substrate 2</i>)

K	negativna kontrola
NAc	<i>nucleus accubens</i>
NFT	neurofibrilarni snop (engl. <i>Neurofibrillary tangle</i>)
NOS	NO sintaza (engl. <i>Nitric oxide synthase</i>)
NTS	<i>nucleus tractus solitarius</i>
PCNA	jezgrin antigen proliferirajućih stanica (engl. <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SD	standardna prehrana (engl. <i>Standard Diet</i>)
SN	<i>substantia nigra</i>
Stat3	prijenosnik signala i aktivator transkripcije 3 (engl. <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TBS	Tris pufer (engl. <i>Tris Buffered Saline</i>)

1. UVOD

1.1. Molekularni mehanizmi koji doprinose razvoju inzulinske rezistencije i staničnog oštećenja kod pretilosti

Prekomjerno povećana tjelesna težina narušava zdravlje osobe i rizični je čimbenik za kronične bolesti kao što su hipertenzija, ishemijska bolest srca, neki oblici malignih bolesti i dijabetes tipa II. Dijabetes tipa II je kronična bolest u kojoj dolazi do inzulinske rezistencije te poremećaja metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina (1). U početnoj fazi karakterizira ga hiperinzulinemija i hiperglikemija, a kad dođe do iscrpljivanja kompenzatornih mehanizama smanjeno lučenje inzulina, hiperglukagonemija, povišena glukoza nastala metabolizmom jetre i otpornost na inzulin što u konačnici onemogućava održavanje normoglikemije i ako se ne liječi dovodi do smrti (2). Uslijed hiperglikemije javljaju se simptomi pojačane žeđi i s tim povezanog učestalog mokrenja, dok se stanično gladovanje manifestira čestim osjećajem gladi i prejedanjem (3). Razvoj bolesti dovodi do makrovaskularnih (koronarna bolest, bolest perifernih arterija i moždani udar) i mikrovaskularnih (retinopatija, neuropatija i nefropatija) komplikacija koje umanjuju kvalitetu života (4). Treba naglasiti da se dijabetes smatra rizičnim čimbenikom za razvoj Alzheimerove bolesti i drugih neurodegenerativnih bolesti (5). Vodeći rizični čimbenici za nastanak dijabetesa tipa II su pretilost, stres i starenje. Sva tri čimbenika dovode do promjena u hormonskoj ravnoteži koje su osobito dramatične kod pretilosti jer masno tkivo djeluje kao endokrini organ (6). Pretilost, odnosno povećana količina masnog tkiva povezana je s hipoksijom. Zato što angiogeneza ne prati rast masnog tkiva, distalni dijelovi tkiva su slabije prokrvljeni pa stoga i slabije oksigenirani te zakinuti za tvari potrebne za preživljavanje stanica. Hipoksija i nedovoljna doprema hranjivih tvari dovode do smrti stanica, odnosno nekroze tkiva što ima za posljedicu upalu (7). Konstantna upala je podloga razvoja inzulinske rezistencije i kardiovaskularnih bolesti (8).

1.1.1 Pretilost kao rizični čimbenik za poremećaje metabolizma željeza

Željezo je metal kojeg u ljudskom tijelu ima više od drugih metala. Mozak, poput jetre, sadrži puno veće koncentracije željeza nego bilo kojeg drugog metala. U mozgu je raspodjela željeza nejednaka, a povećane koncentracije nalazimo u bazalnim ganglijima, točnije unutar struktura *substantia nigra*, *putamen*, *nucleus caudatus*, *globus pallidus*, *nucleus ruber* i *nucleus*

dentatus (9). Željezo je esencijalno u mnogim metaboličkim procesima uključujući sintezu DNA, RNA i proteina, stvaranje mijelina, razvoj dendritičkog stabla, te sudjelovanje u enzimskim reakcijama - kao kofaktor mnogim hemskim i nehemskim enzimima (10). Željezo u mozgu odlaže se u obliku feritina, s jako malim postotkom slobodnog reaktivnog željeza. Oslobođanje iona željeza iz kompleksa s proteinima može dovesti do oksidativnog stresa stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Smatra se da su slobodni kisikovi radikali uključeni u peroksidaciju lipida stanične membrane što dovodi do povećane fluidnosti membrane te u konačnici razora membrane i vodi u smrt stanice. Isto tako, ROS uzrokuju oksidaciju proteina i DNA što nepovoljno djeluje na stanicu (11). Homeostaza željeza neophodna je za normalno funkcioniranje mozga, posebno u pogledu učenja i pamćenja (9). Proteini važni za metabolizam željeza u organizmu, a osobito mozgu, su: feritin, transferin i feroportin. Feritin skladišti željezo vezanjem unutar stanice tako što ga održava topljivim i netoksičnim te stoga zaliha feritina odražava zalihe željeza u tkivu. Feritin je isto tako i pozitivan reaktant akutne faze upale i očekuje se njegovo povećanje u stanjima poput pretilosti (11). S obzirom da se bakterije i paraziti koji stvaraju upalu koriste željezom, u upalnim stanjima povećava se ekspresija feritina i transferina kako bi se uklonilo željezo iz krvi i na taj način sačuvalo. Isto tako u upalnom stanju nastoji se smanjiti dodatni oksidativni stres izazvan ionima željeza. Pretilost je upalno stanje pa usprkos tome što nisu prisutne bakterije i paraziti šalju se signali za skladištenje željeza (7). Transferin je transportni protein koji čvrsto, ali reverzibilno veže željezo u neutralnom pH te ga prenosi u stanicu. Transferin s vezanim željezom dolazi do transferinskog receptora na površini stanice (12). Transferinski receptori nalaze se u brojnim tkivima, uključujući i mozak. Njihova ekspresija se povezuje sa staničnim rastom i diferencijacijom (13). Kompleks transferina i njegovog receptora biva unesen u stanicu endocitozom (12). U kiselom pH željezo se otpušta s transferina, a transferin i njegov receptor vraćaju se na površinu stanice te se transferin vraća u krvotok (14). Feroportin je transmembranski protein koji jedini prenosi željezo iz unutrašnjosti stanice u međustanični prostor. Nalazi se na bazolateralnoj površini hepatocita, duodenalnih enterocita i na staničnoj membrani makrofaga. Negativno ga regulira hormon hepcidin koji potiče njegovu degradaciju i zadržavanje unutar stanice (15). Potrebna je ravnoteža između esencijalnih i potencijalno toksičnih funkcija željeza, a to je posredovano interakcijom hepcidina s feroportinom i njihovim skladnim djelovanjem (7). Feroportin djeluje u korist povećanja željeza u serumu tako što iznosi željezo iz staničnih zaliha, dok hepcidin ima suprotno djelovanje i djeluje u korist stvaranja zaliha željeza u stanicama (7, 16).

Primarno mjesto izlučivanja hepcidina je jetra. Međutim, hepcidin se također proizvodi u brojnim drugim tkivima kao što su srce, leđna moždina, masno tkivo, mijeloidne stanice, makrofagi, monociti i druge stanice. Doprinos ekstrahepatične proizvodnje hepcidina na ukupnu razinu hepcidina još je upitan (17). Poseban naglasak stavljen je na proizvodnju hepcidina u masnom tkivu. Ekspresija hepcidina iz adipocita povećana je u pretilosti, dok ona iz hepatocita ne doživljava povećanje. Uzimajući u obzir povećani sadržaj masnog tkiva i povećanu ekspresiju adipocitnog hepcidina, pretpostavlja se da masno tkivo doprinosi cirkulirajućoj razini hepcidina (17, 18). Upalni medijator interleukin 6 (IL-6) potiče sintezu hepcidina putem aktivacije transkripcijskog čimbenika Stat3 (*engl. Signal transducer and activator of transcription 3*) koji se veže na promotorsku regiju hepcidina kako bi aktivirao njegovu transkripciju. Druga varijanta regulacije hepcidina uključuje adipokine koji su također povišeni u pretilosti, a od kojih je najznačajniji leptin (16). Adipokini se otpuštaju iz adipocita pa povećana količina adipocita rezultira povećanom koncentracijom adipokina u krvi. Pokazalo se da leptin stimulira proizvodnju hepcidina na sličan način kao i IL-6 jer leptin i IL-6 imaju zajedničke biološke značajke (16, 19). Hecpidin se veže na feroportin te ga upućuje na razgradnju. Zbog razgradnje feroportina smanjuje se apsorpcija željeza iz crijeva u krvotok i sprječava se izlazak željeza iz makrofaga. Posljedica je nakupljanje željeza u tkivima (7). Nakupljanje željeza povećava inzulinsku rezistenciju na još nerazjašnjen način (20). S obzirom da je transferin prijenosnik željeza od mjesta apsorpcije do ciljnih stanica očekuje se da koncentracija transferinskih receptora korelira sa koncentracijom nakupljenog željeza u tkivima, no to nije slučaj. Lokalizacija transferinskih receptora razlikuje se od mjesta nakupljanja željeza. Mnoga područja mozga bogata transferinskim receptorima nisu povezana s većom apsorpcijom željeza u stanice. Raspored transferinskih receptora može se povezati sa rasporedom ostalih neuropeptida što ukazuje na to da transferin može imati neuromodulatornu ulogu u mozgu, odnosno može mijenjati prijenos impulsa putem drugog transmitora (13).

1.1.2 Dušikov oksid i inzulinska rezistencija

Dušikov oksid (NO) je penetrantna mala molekula, velike reaktivnosti, koja djeluje u neposrednoj blizini mjesta nastajanja.. Nastaje iz aminokiseline L-arginina djelovanjem enzima NO sintaze (*engl. Nitric oxide synthase, NOS*) (21). Fiziološki NO djeluje kao neurotransmiter, ali u patološkim stanjima - poput ishemije - stvara se veća količina NO koji tada djeluje neuroprotektivno i sprječava mehanizme neurotoksičnosti (22). NO također može uzrokovati

oštećenje stanica u dijabetesu jer pojačava ulazak glukoze u stanice tako što djeluje na prijenosnike glukoze (23). Poznata su tri izoforme NO sintaze: neuralna nNOS, endotelna eNOS i imunološki izazvana iNOS. Neuralna izoforma nNOS nalazi se samo u neuronima, a proizvodnja NO posredovana djelovanjem nNOS može uzrokovati neuronsku leziju (21, 24).

1.1.3 Djelovanje inzulina i inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 na fosforilaciju mikrotubulima pridruženih proteina i nastanak amiloidnih plakova

Tau je primarno, ali ne i isključivo neuralni protein. Njegova uloga je da veže i stabilizira mikrotubule te tako potpomaže neuronski rast i polarizaciju neurona, odnosno razvoj aksona i dendrita. Čini se da inzulin i inzulinu-sličan činitelj rasta 1 (IGF-1, *Insulin-like Growth Factor 1*) imaju ulogu u fosforilaciji tau proteina. Njegovom fosforilacijom postiže se veći afinitet kod vezanja za mikrotubule (25, 26), a hiperfosforilacijom se taj afinitet smanjuje pa tau ostaje nevezan za mikrotubule i posljedično se stvaraju netopljivi tau agregati – neurofibrilarni snopovi (NFT) (27, 28). Zabilježena je povećana tau fosforilacija u mozgu dijabetičnih štakora uzrokovana hiperinzulinemijom (29). Neprimjerena fosforilacija tau dovodi do njegove disfunkcije, a samim time i do smanjene vitalnosti stanice (25). Nakupljanje tau agregata uključeno je u patogenezu Alzheimerove bolesti (27).

U patogenezu Alzheimerove bolesti uključeni su i senilni plakovi. β -amiloid ($A\beta$) nastaje iz amiloidnog prekursorskog proteina (APP) te nakon izlučivanja u izvanstanični prostor ima sposobnost agregacije sa drugim proteinima pa nastaju senilni plakovi (30). Višak $A\beta$ može se ukloniti endocitozom pomoću proteina povezanog s LDL receptorom ili izravnom proteolitičkom izvanstaničnom degradacijom. Taj proces uključuje inzulin-degradirajući enzim (IDE). Čini se da inzulin potiče izlučivanje $A\beta$, a smanjuje njegovu degradaciju mehanizmom u kojem se inzulin i $A\beta$ natječu za mjesto na IDE (31, 32). Dok u Alzheimerovoj bolesti nastaju $A\beta$ plakovi u mozgu, u dijabetesu tipa II postoje amiloidni plakovi u Langerhansovim otočićima nastali od amiloidnog polipeptida Langerhansovih otočića (engl. *Islet Amyloid Polypeptide*, IAPP) (33). $A\beta$ i IAPP u vodenom okruženju spontano stvaraju agregate. Uloga im je još upitna, ali pretpostavlja se uzrokuju oštećenje membrane te su stoga citotoksični (34). S obzirom da oba proteina *in vitro* spontano stvaraju agregate, u organizmu vjerojatno postoji mehanizam koji to sprječava, a moguće je da on uključuje šaperone, proteine koji pomažu pravilno smatanje proteina. Novonastali proteini prvo su vezani na šaperone kako se ne bi stvorili agregati od netopljivih proteina. Šaperoni

omogućuju prijenos proteina na odgovarajuće mjesto u stanici. Svaki šaperon veže i prenosi brojne proteine koji su strukturalno slični stoga postoji mogućnost da A β i IAPP dijele jedan ili više šaperona. Unatoč tome, primjećeno je da nije povećana frekvencija stvaranja amiloidnih agregata u mozgu oboljelih od dijabetesa tipa II, ali se povećava opseg amiloidnih agregata s trajanjem dijabetesa tipa II (35).

1.1.4 Pokazatelji oštećenja i pokušaja oporavka tkiva u dijabetesu tipa II

Jezgrin antigen proliferirajućih stanica (engl. *Proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) je jezgrin protein koji je maksimalno povišen u S fazi proliferirajućih i transformiranih stanica. PCNA je dio mašinerije potrebne za replikaciju eukariotske DNA (36, 37). Povećana prisutnost PCNA antigena ukazuje na pojačanu replikaciju što možemo povezati oštećenjem tkiva i posljedično s potrebom za stvaranjem novih stanica, odnosno s regeneracijom tkiva. Eksperimentalno, regeneracija tkiva, u našem slučaju tkiva jetre, može biti potaknuta bilo kojim postupkom koji će ukloniti ili ubiti veliki postotak jetrene mase. Gubitak parenhima brzo izaziva val proliferacije stanica tako da se ukupna jetrena masa vrati na normalnu masu (36).

2.1 Antidijabetici

Dijabetes mellitus tipa II karakterizira smanjeno lučenje inzulina, hiperglukagonemija, glukoneogeneza i otpornost na inzulin što u konačnici rezultira hiperglikemijom (2). Antidijabetici metformin i liraglutid ispravljaju metabolizam glukoze, ali posredno djeluju i na upalu te smanjuju količinu željeza u tkivu. Liraglutid je analog glukagonu sličnom peptidu-1 (engl. *glucagon-like protein-1*, *GLP-1*) i agonist GLP-1 receptoru (38). GLP-1 je crijevni hormon koji se izlučuje iz endokrinih L-stanica nakon uzimanja hrane. Ima nekoliko funkcija koje uključuju pojačanje odgovora inzulina na glukozu i osjećaja sitosti, usporavanje pražnjenja želuca, suzbijanje izlučivanja glukagona iz gušterače i sinteze glukoze u jetri (39). Liraglutid se kao analog GLP-1 veže na G-protein povezan s GLP-1 receptorom na površini β -stanica gušterače. Vezna mjesta visokog afiniteta za GLP-1 nalaze se gušterači, enteričkim živcima, vagusnom živcu, srcu, bubrezima i masnom tkivu. GLP-1 receptori raspodijeljeni su na mnogim područjima mozga povezanim s unosom hrane i tjelesnom težinom, uključujući arkuatne (ARC) i dorzomedijalne jezgre hipotalamusa (DMH), parabrahijalne jezgre, *nucleus accumbens* (NAc), *nucleus tractus solitarius* (NTS) i područje postreme (40). Kada su razine glukoze u krvi visoke, liraglutid uzrokuje

dozirano otpuštanje inzulina i istovremeno smanjuje neprimjereno povišeno izlučivanje glukagona. Kako koncentracija glukoze u krvi postaje sve manja, liraglutid smanjuje izlučivanje inzulina i prestaje inhibirati otpuštanje glukagona. Liraglutid reducira glad i smanjuje kalorijski unos uz pomoć odgađanja pražnjenja želuca što rezultira manjom tjelesnom težinom i masnoćom. Udruženo s kontroliranjem razine glukoze u krvi, to pozitivno djeluje na upravljanje dijabetesom (38).

Metformin je derivat gvanidina i djeluje prvenstveno pojačavanjem djelovanja inzulina u jetri kako bi se smanjila proizvodnja glukoze. Treba naglasiti da rezultat nije povećana razina inzulina u krvi nego njegovo pojačano djelovanje (41). Poboljšanje djelovanja inzulina u skeletnim mišićima također pridonosi terapijskom djelovanju metformina, uglavnom rezultirajući povećanim odlaganjem glikogena. To se postiže translokacijom prijenosnika glukoze GLUT-4 (engl. *Glucose transporter 4*) na površinu stanične membrane što olakšava ulazak glukoze u mišićne stanice (4, 42). Zajedno, ove mjere smanjuju glukozu u krvi u pogledu hiperglikemije s vrlo malo potencijala za izazivanje hipoglikemije. Povećanje anaerobnog metabolizma u crijevnoj stijenci vjerojatno je također klinički značajan mehanizam metformina protiv hiperglikemije. Isto tako, pokazalo se da metformin povećava cirkulirajuće razine GLP-1 povećavanjem razine samog GLP-1 i/ili smanjenjem aktivnosti dipeptidil peptidaze-4 (DPP-4), enzima koji je odgovoran za inaktivaciju GLP-1 u tkivu i cirkulaciji. Metformin može inducirati ekspresiju GLP-1 receptora na površini β -stanica gušterače (43). Oba spomenuta antidijabetika, liraglutid i metformin, djelomično koriste isti mehanizam kontroliranja hiperglikemije putem GLP-1. Pretpostavlja se da je još jedan od mehanizama metformina inhibicija staničnog disanja na razini kompleksa I respiratornog lanca što uzrokuje smanjeno stvaranje energije u obliku ATP-a (adenozit trifosfat) i akumulaciju AMP (adenozin monofosfat). Rezultat promjene u ravnoteži stanične energije je povećana aktivnost AMP kinaze koja potiče djelovanje inzulina i smanjuje glukoneogenezu. Isto tako, povećava se i koncentracija cirkulirajućeg cAMP (ciklički adenzin monofosfat) koji se suprotstavlja hiperglikemijskom djelovanju glukagona (4). Jetra se smatra glavnim mjestom djelovanja metformina jer ima visoku razinu ekspresije SLC22A1, prijenosnika metformina. Osim toga, koncentracija metformina je veća u portalnoj cirkulaciji nego drugdje u tijelu, što bi moglo doprinijeti nakupljanju metformina u jetri. U jetri metformin utječe na regulaciju apsorpcije glukoze, glukoneogeneze, glikolize i sinteze glikogena u smjeru koji sprječava hiperglikemiju. Metformin povećava aktivnost inzulinskog receptora i supstrata inzulinskog receptora 2 (engl.

Insulin receptor substrate 2, IRS-2) te pospješuje unos glukoze putem povećane translokacije transportera glukoze, kao što je GLUT-1 (engl. *Glucose transporter 1*), na površinu stanične membranu (42).

3.1 Animalni modeli pretilosti i predijabetesa

Predijabetes je metaboličko stanje koje je usko povezano s pretilošću. Neliječen može prerasti u dijabetes mellitus tipa II (4). BMI (engl. *Body Mass Index*) pokazao se kao dobar indikator opće debljine. Koristi se za procjenu prekomjerne tjelesne težine i pretilosti. BMI je omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima (44). Povećan BMI, odnosno povećana tjelesna težina upućuje na povećani rizik za neke kronične bolesti poput hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa II (4). Napravljen je višestupanjski model razvoja dijabetesa. Za prvu fazu karakteristično je dugo razdoblje inzulinske rezistencije i povećana masa β -stanica gušterače. To stanje se može javiti i nekoliko desetljeća prije razvoja dijabetesa (2), stoga je najraniji pokazatelj razvoja dijabetesa niska osjetljivost na inzulin u skeletnim mišićima. U stanju predijabetesa povišene razine inzulina u plazmi omogućuju da razina glukoze u krvi bude normalna. Međutim povišena razina inzulina u plazmi potiče *de novo* lipogenezu pa se u jetri nakuplja masnoća. Dakle masna jetra je prisutna prije početka dijabetesa tipa II (45). Druga faza je razdoblje prilagodbe kad β -stanice ne kompenziraju neosjetljivost stanica na inzulin u tolikoj mjeri pa razina glukoze u krvi varira od normalnih do povećanih vrijednosti. U trećoj fazi β -stanice više nisu sposobne kompenzirati neosjetljivost stanica na inzulin pa vrijednosti glukoze rastu, a razina inzulina opada (2). Mikroangiopatije i makroangiopatije koje se smatraju posljedicama dijabetesa zapravo se javljaju već u stanju predijabetesa. Od dijabetičkih mikroangiopatija razlikujemo retinopatije, nefropatije i neuropatije, a od makroangiopatija ishemijske srčane bolesti i moždani udar (46).

Iako postoje dobro razjašnjeni monogeniski čimbenici koji povećavaju sklonost pretilosti, zapravo je u većini slučajeva uzrok pretilosti multifaktorijalan. Drugim riječima, često je više čimbenika, a ne samo jedan koji utječe na razvoj pretilosti. Razvojem različitih eksperimentalnih životinjskih modela omogućeno je proučavanje i bolje shvaćanje patogeneze metaboličkih sindroma poput dijabetesa tipa II te njihovo liječenje (47). Okolišni i bihevioralni čimbenici svrstavaju se u multifaktorijalne čimbenike te imaju sve veći značaj u razvoju bolesti. Modeli pretilosti potaknuti prehranom koriste se za proučavanje multifaktorijalnih uzroka pretilosti dok su

genetski modificirani modeli bolji izbor za ispitivanje lijekova. Wistar i Sprague-Dawley štakori korišteni su kao modeli pretilosti izazvani multifaktorijskim čimbenicima, odnosno prehranom. Mnogi Wistar i Sprague-Dawley štakori postaju pretili kada su hranjeni energetski bogatom hranom kao što je dijeta bogata mastima i ugljikohidratima (engl. *High Fat High Sucrose Diet*, HFHSD) (48). Prehrana bogata mastima uz veći kalorijski unos specifično smanjuje djelovanje inzulina i leptina u središnjem živčanom sustavu već nakon nekoliko dana od početka dijeta. Njihova uloga u mozgu je obavješćavanje o zalihama masnog tkiva. U slučaju manjka inzulina i leptina ili njihovog smanjenog djelovanja mozak dobiva signale da organizam gladuje te pojačava apetit i pojačano skladišti mast. Javlja se začarani krug gdje se pojačava apetit što je veći unos hrane što posljedično dovodi do prekomjerne tjelesne težine i pretilosti (49). Napravljena je studija u kojoj su uspoređeni Wistar i Sprague Dawley štakori. Rezultati su pokazali da dijeta bogata mastima povećava tjelesnu masu i masno tkivo, razinu leptina i adiponektina u plazmi, a smanjuje oralnu toleranciju na glukozu u obje vrste štakora. Wistar štakori su unosili veće količine hrane i stoga su oni prije i više dobili na tjelesnoj težini. Većina metaboličkih učinaka uzrokovanih dijetom bogatom mastima bila je ranije otkrivena ili jače izražena u Wistar štakora, ali unatoč tome obje vrste štakora mogu se koristiti kao modeli pretilosti izazvani prehranom (48). U drugoj studiji uspoređen je utjecaj dijeta bogate mastima na muške i ženske štakore. I muški i ženski štakori dobili su na težini, ali samo su muški štakori postali pretili. Razlog tome su spolni hormoni zbog kojih ženski štakori manje dobivaju na težini u usporedbi sa muškim štakorima. Nakon odstranjivanja jajnika ženski štakori su dobivali na težini jednako kao i muški štakori. Isto tako, dijeta bogata mastima blago je promijenila sistemsku osjetljivost na inzulin kod mužjaka, ali ne i kod ženki. Inzulin je brže odstranio višak glukoze iz krvotoka kod ženki, te je povratak glukoze na početnu vrijednost kod njih bio sporiji (50).

Dosadašnje spoznaje govore kako je već i predijabetes bolest koju ima smisla liječiti, a metformin i liraglutid bi mogli imati povoljan učinak što se može testirati na životinjskom modelu.

2. HIPOTEZA

Povećana tjelesna težina povećava zalihe željeza u jetri i dopaminergičkim jezgrama mozga ženki Sprague Dawley štakora izloženih masnoj i slatkoj hrani. Terapija metforminom i liraglutidom smanjuje količinu željeza. Paralelno s nakupljanjem željeza dolazi i do nakupljanja amiloida koji potiče neurodegeneraciju, a davanje antidijabetika djeluje neuroprotektivno i smanjuje količinu amiloida.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Uporabom histološkog bojenja jetre Perlsovom metodom i imunohistokemijskim bojenjem na antigen PCNA usporediti zalihe željeza i regenerativnu sposobnost jetre životinja izloženih standardnoj dijeti i dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, a zatim procijeniti utjecaj antidijabetika metformina i liraglutida na naredne dvije skupine životinja hranjene mastima i šećerima.
2. Uporabom modifikacije histološkog bojenja Pearls-DAB na rezovima mozga i imunohistokemijskim bojenjem na transferinske receptore procijeniti zalihe željeza u dopaminergičkim jezgrama mozga kod 4 skupine životinja.
3. Uporabom histološke boje Kongo crvene i imunohistokemijom na pTau procijeniti količinu amiloida i brojnost neurofibrilarnih snopova kao markera neurodegenerativnih promjena na rezovima mozga u 4 skupine životinja.
4. Međusobno usporediti učinak metformina i liraglutida na zalihe željeza u jetrenom i moždanom tkivu predijabetičkih životinja.
5. Usporediti količinu amiloida i neurofibrilarnih snopova u mozgu životinja na standardnoj dijeti i dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, a zatim međusobno usporediti životinje hranjene obogaćenom dijetom koje nisu tretirane antidijabeticima sa skupinama koje su tretirane antidijabeticima. Isto učiniti s imunoreaktivnošću na nNOS kao dodatnim markerom neurodegeneracije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Ovo istraživanje je studija parova gdje su skupine bile životinje na standardnoj dijeti i životinje na dijeti bogatoj mastima i šećerima, te životinje koje su pored masne i slatke hrane tretirane antidijabeticima metforminom i liraglutidom.

4.2. Pokusne životinje

Istraživanje je napravljeno na arhivi tkiva koja je proizašla iz projekta 'Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora kod pretilih, predijabetičkih štakora starije dobi tretiranih s metforminom i liraglutidom' voditeljice prof. dr. Ines Drenjančević. Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16.prosinca 2016). Za ovaj dio istraživanja zatraženo je dodatno etičko odobrenje koje je pozitivno riješeno (Klasa: 602-04/18-08/07; Broj: 2158-61-07-18-105; dana 6.lipnja 2018). U studiji su obuhvaćene 32 ženke Sprague Dawley štakora podijeljene u 4 skupine: 1. životinje na standardnoj dijeti, 2. životinje na dijeti obogaćenoj mastima i šećerima, 3. životinje na obogaćenoj dijeti tretirane metforminom, 4. životinje na obogaćenoj hrani tretirane liraglutidom. Životinje su ušle u studiju s navršena 44. tjedna starosti. Do 44. tjedna hranjene su standardnom dijetom, a zatim su prebačene na dijetu koja odgovara njihovoj grupi. Trećoj i četvrtoj skupini životinja je nakon 6 tjedana hranjenja uvedena antidijabetička terapija. Sve životinje žrtvovane su u 64. tjednu starosti kada su prikupljena tkiva. Žrtvovanje je izvršilo osoblje verificirano za rad s životinjama. Tkiva su fiksirana 4% paraformaldehidom u trajanju od 48 sati na +4°C, zatim krioprotektirana u rastućem gradijentu saharoze (10%, 20%, 30%) u PBS-u (engl. *Phosphate Buffered Saline*) na +4 °C u trajanju potrebnom da tkiva potonu, odnosno dehidriraju maksimalno za okruženje u kojemu se nalaze. Nakon osmotske dehidracije, tkiva su smrznuta u pothlađenom 2-metilbutanu (Fisher chemicals) i pohranjena na -80 C do daljnjeg postupanja.

4.3. Metode

32 uzorka fiksiranog, krioprotektiranog i smrznutog mozga narezana su u koronarnom smjeru na kriostatu (Leica CM3050S, Wetzlar, Njemačka) na 35µm i do daljnje obrade spremljena

u otopinu de Olmos (51) na -20°C . Rezovi isprani u 1xPBS-u od de Olmosa navučeni su na stakla koja su presvučena želatinom, osušeni na sobnoj temperaturi preko noći i obojani modificiranom metodom Perls-DAB (Prusko modrilo) za dokazivanje malih količina željeza. Susjedni rezovi su obojani histološkim bojanjem Kongo crvenom (52) kojom se prikazuju plakovi amiloida i imunokemijskim bojanjima kojima se dokazuju transferin, nNOS i pTau. Za dokazivanje transferina i pTau korištena su biotinilirana kozja protu-mišja protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD), a za dokazivanje nNOS kozja protu-zečja protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD).

Trideset dva uzorka fiksirane, krioprotektirane i smrznute jetre izrezana su na debljinu 20 μm pomoću kriostata i do daljnje obrade spremljena u otopinu de Olmos na -20°C . Rezovi isprani od de Olmosa navučeni su na predmetna želatinirana stakla i osušeni na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon sušenja obojeni su histološkom bojom Prusko modrilo (metoda po Perlsu) (53) kojom se dokazuje prisutnost željeza, a vidljivost reakcije je pojačana inkubiranjem u otopini diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Na rezovima jetre radilo se imunohistokemijsko bojanje pomoću kozjih protu-mišjih protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) kojim se dokazuje antigen proliferacije PCNA. Histološki preparati su fotografirani pod mikroskopom (Zeiss Axio MOT 2, Jena, Germany) s kamerom Olympus DP-70 i kvantificirani u programu ImageJ v.1.80 s njegovim FIJI dodatkom (engl. *plugin*).

4.3.1. Metoda Perls-DAB (Prusko modrilo)

Rezovi jetri i mozgovu izvađeni su iz de Olmosa i isprani u PBS-u te navučeni na želatinirana stakla. Uslijedilo je uranjanje preparata u destiliranu vodu na 5 minuta i inkubacija u Pruskom modrilu sat vremena. U pripremi rezova koji služe kao negativna kontrola (K) preskočen je korak inkubacije u Pruskom modrilu. Sastav Pruskog modrila čini jedan dio 4% kalijevog ferocijanida $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, dva dijela destilirane vode i jedan dio 0,2N klorovodične kiseline (HCl). Nakon inkubacije preparati se uranjaju u destiliranu vodu dva puta po 5 minuta. Pripremljena je otopina 1% vodikovog peroksida (H_2O_2) i metanola u kojoj su preparati inkubirani 75 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ uz stalno miješanje, uključujući i negativne kontrole. Vodikov peroksid koristimo za blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaza i spriječavanje pozadinskog obojenja, odnosno lažno pozitivnih rezultata. Sljedeći korak je razvijanje u DAB-u koji je pripravljen po uputama

proizvođača. DAB omogućuje vizualizaciju nakupina željeza u tkivu. Kalijev ferocijanid ima pseudoperoksidazno svojstvo zbog kojeg oksidira supstrat DAB i nastaje obojenje. Za razvijanje DAB-a u tkivima jetre bile su potrebne 3 minute, a za tkiva mozga 10 minuta. Ponovno su preparati isprani u destiliranoj vodi dva puta po 5 minuta i konačno pokriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnim stakalcem.

4.3.2. Određivanje amiloidnih plakova (Kongo crvenilo)

Nakon što su izvađeni iz de Olmosa, rezovi mozgovia isprani su 3 puta po 10 minuta u 1x PBS-u i zatim stavljeni u destiliranu vodu na 30 sekundi. Slijedila je inkubacija od 7 minuta u otopini Kongo crvenila (Congo red 0.1%, 50%-tni etanol do 100ml). Rezovi su isprani dva puta vodom iz slavine na 30 sekundi potom prebačeni u otopinu diferencijatora (natrijev hidroksid 0.2%, 80%-tni etanol do 100ml) do obezbojenja. Nakon toga rezovi su isprani u destiliranoj vodi još tri puta po 30 sekundi i navučeni na želatinirana stakla. Preparati su osušeni na zraku na sobnoj temperaturi te pokriveni Vectashield medijem za pokrivanje (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i pokrovnicama.

4.3.3. Određivanje transferina i pTau

Nakon vađenja iz de Olmosa rezovi su isprani tri puta u 1x PBS-u. U svrhu blokiranja endogenih peroksidaza rezovi su stavljeni u predtretman s 1% vodikovim peroksidom dva puta po 20 minuta. Rezovi su prebačeni u blokirajuću otopinu te inkubirani na +4°C tijekom 4 sata uz stalno miješanje kako bi se blokiralo nespecifično vezanje protutijela. Sadržaj blokirajuće otopine je 1% BSA (*engl. Bovine Serum Albumin*) bez detergenta, 5% kozjeg seruma u 1x PBS. Polovica rezova prebačena je u otopinu primarnog protutijela na transferin (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), a druga polovica u otopinu primarnog protutijela na pTau (Millipore, Temecula, CA, SAD). Protutijela za transferin i pTau su pripravljena razrjeđivanjem u blokirajućoj otopini u omjeru 1:500. Uslijedila je inkubacija preko noći na +4 °C uz stalno miješanje, a nakon inkubacije rezovi su isprani tri puta po 10 minuta u 1xPBS-u. Kod rezova koji služe kao negativne kontrole preskačemo korak inkubacije u primarnom protutijelu. Rezovi su premješteni u otopinu sekundarnog kozjeg protu-mišjeg protutijela (Jackson ImmunoResearch, 130120) razrijeđenog u blokirajućoj otopini u omjeru 1:500. Inkubacija se radila na +4°C uz neprestano miješanje u

trajanju od 4h. Rezovi su potom isprani tri puta po 10 minuta u 1x PBS-u te premješteni u otopinu tercijarnog kompleksa (1:250 avidin + 1:250 biotin HRP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) i tako su inkubirani 2 sata na +4°C uz neprekidno miješanje. Nakon inkubacije u tercijarnom kompleksu rezovi su isprani 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u i jednom po 10 minuta u 1xTBS-u (*engl. Tris Buffered Saline*). Uslijedila je vizualizacija imunoreaktivnosti u DAB-u čije je razvijanje za transferin trajalo 3 minute, a za pTau 3 minute i 30 sekundi. Vrijeme razvijanja DAB-a jednako je za sve grupe životinja. Rezovi su zatim navučeni na predmetna stakla, osušeni na zraku na sobnoj temperaturi te pokriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i pokrovnim stakalcem.

4.3.4. Određivanje nNOS

Rezovi mozгова izvađeni iz de Olmosa isprani su tri puta 1x PBS-om. Uslijedio je predtretman 1% vodikovim peroksidom dva puta po 20 minuta uz neprekidno miješanje na +4°C. Pripremljena je blokirajuća otopina u kojoj su rezovi bili inkubirani 4 sata. Blokirajuću otopinu čini 5% kozjeg seruma, 1% detergenta TRITON 100X i BSA dopunjen do 100%. Za pravljenje otopine primarnog protutijela korištena je blokirajuća otopina bez detergenta, a primarno protutijelo (Chemicon, Temecula, CA, SAD) dodano je u omjeru 1:1000. Uslijedila je inkubacija preko noći na +4°C uz neprekidno miješanje. Rezovi su isprani tri puta po 10 minuta u 1x PBS-u i potom premješteni u otopinu sekundarnog kozjeg protu-zečjeg protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) priređenog s blokirajućom otopinom u omjeru 1:1000. Inkubacija je trajala 4 sata. Rezovi su isprani tri puta po 10 minuta u 1x PBS-u i nakon toga su inkubirani u otopini tercijarnog kompleksa (1:250 avidin + 1:250 biotin HRP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) kroz 2 sata na +4°C uz neprestano miješanje. Rezovi su ponovno isprani tri puta po 10 minuta u 1x PBS-u i jednom u 1x TBS-u te razvijeni u DAB-u kroz 2 minute i 30 sekundi i zatim navučeni na stakla. Osušeni su na zraku na sobnoj temperaturi i pokriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i pokrovnim stakalcem.

4.3.5. Određivanje PCNA

Rezove jetri koje su izvađene iz de Olmosa isprane su citratnim puferom pH=6 (Na_2HPO_4 0,128mol/dm³, monohidrat limunska kiselina 0,0357mol/dm³) na temperaturi od 95°C kroz jedan

sat i nakon toga su stavljene na hlađenje. Tijekom fiksacije tkiva nastale su križne reakcije formalina sa amino skupinama proteina što je rezultiralo stvrđnjavanjem tkiva i maskiranjem antigena. Citratni pufer se koristi kako bi se pokidale veze između formalina i proteina i na taj način otkrili antigeni. Uslijedio je predtretman 1% vodikovim peroksidom dva puta po 20 minuta. Rezovi su potom prebačeni u blokirajuću otopinu i tako su inkubirani 4 sata na +4°C uz stalno miješanje. Priređena je otopina primarnog protutijela na PCNA antigen (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, SAD) s blokirajućom otopinom u omjeru 1:1000. U takvoj otopini rezovi su inkubirani preko noći na +4°C uz neprekidno miješanje na tresilici. Nakon inkubacije slijedilo je ispiranje tri puta po 10 minuta u 1x PBS-u i prebacivanje rezova u otopinu sekundarnog kozjeg protu-mišjeg protutijela (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD) koje je također pripravljeno sa blokirajućom otopinom, ali u omjeru 1:500. Inkubacija na +4°C uz neprestano miješanje trajala je 4 sata. Rezovi su isprani tri puta po 10 minuta u 1xPBS-u. Zatim su prebačeni su u otopinu tercijarnog kompleksa (1:250 avidin + 1:250 biotin HRP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) na 2 sata uz neprekidno miješanje na +4°C. Po završetku inkubacije, uzorci su isprani tri puta u 1x PBS-u po 10 minuta, te jednom u 1x TBS-u kroz 10 minuta. Uslijedila je vizualizacija imunoreaktivnosti u DAB-u čije je razvijanje trajalo 90 sekundi. Vremena razvijanja jednaka su za sve grupe. Rezovi su navučeni na stakla, osušeni na zraku na sobnoj temperaturi i potom pokriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i pokrovnim staklom.

4.4. Statističke metode

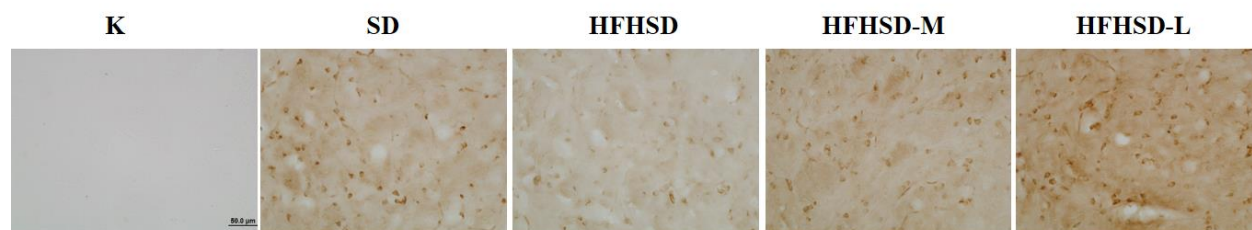
Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Saphiro-Wilkovim testom. U slučaju normalne raspodjele numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike numeričkih varijabli normalno raspodijeljenih između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t-testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U-testom. Sve su P-vrijednosti dvostrane. Za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata odabrana je razina značajnosti $\alpha = 0,05$. Statistička obrada napravljena je u programu Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD).

5. REZULTATI

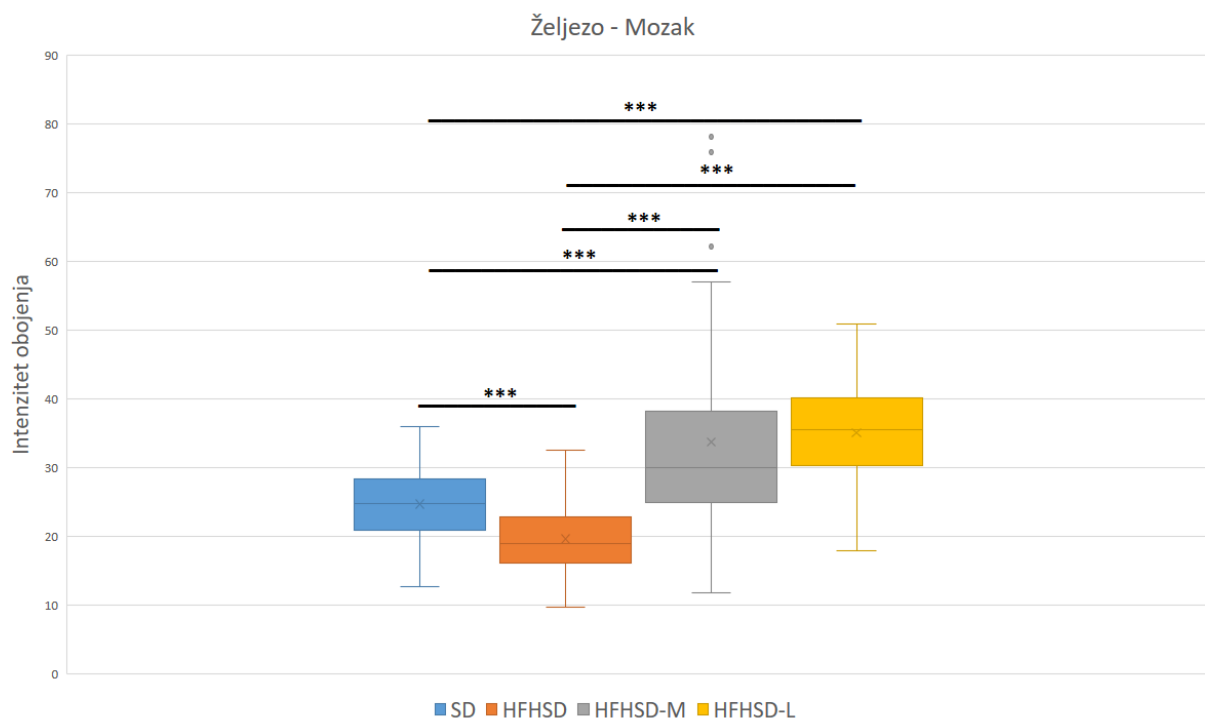
U tkivima mozga 4 skupine ženki Sprague Dawley štakora mjenen je intenzitet obojenja histološkog željeza, transferina, proteina pTau i nNOS-a. U mozgovima bojanim Kongo crvenom kvantificirani su pikseli žutog tonaliteta za koje smo smatrali da predstavljaju amiloid. Mjerenja na mozgu rađena su u regiji *substantia nigra* (SN). Također, uspoređen je intenzitet obojenja histološkog željeza i antigena PCNA u jetrima 4 skupine štakora. Mjerenja su rađena na dva mjesta u jetri – periferno uz kapsulu i centralno uz portalnu venu jer su ova mjesta funkcionalno različita. Četiri skupine štakora o kojima se govori dalje u tekstu su: skupina na standardnoj prehrani (SD), skupina na masnoj i slatkoj prehrani (HFHSD), skupina HFHSD životinja tretirana metforminom (HFHSD-M) i skupina HFHSD životinja tretirana liraglutidom (HFHSD-L).

5.1. Nakupljanje željeza u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima

U mozgu intenzitet obojenja histološkog željeza slijedi normalnu distribuciju u slučaju usporedbe SD skupine sa HFHSD i HFHSD-L te u slučaju međusobne usporedbe HFHSD i HFHSD-L skupina. Intenzitet obojenja u slučaju usporedbe HFHSD-M skupine sa SD i HFHSD skupinama ne slijedi normalnu distribuciju. Najniže razine željeza u SN imaju HFHSD ženke ($\bar{x} = 19,602$, $SD=5,287$) dok najviše razine imaju HFHSD-L ($\bar{x} = 35,038$, $SD=6,628$). HFHSD značajno snižava razine željeza u SN u odnosu na SD prehranu ($p<0,001$). Oba antidijabetika dovode do značajnog povećanja željeza i u odnosu na SD i u odnosu na HFHSD životinje ($p<0,001$) (Slike 1 i 2).



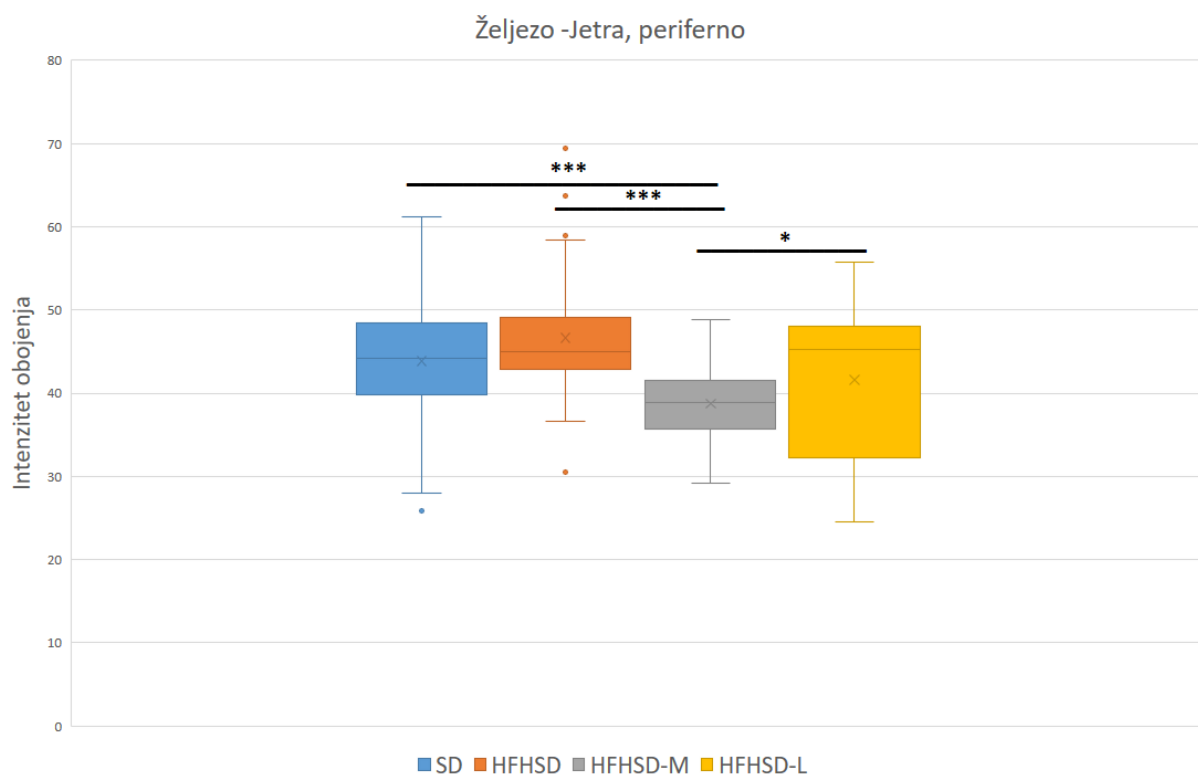
Slika 1. Prikaz rezultata histološkog bojenja Perls-DAB za dokazivanje prisutnosti željeza u strukturi SN ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50μm.



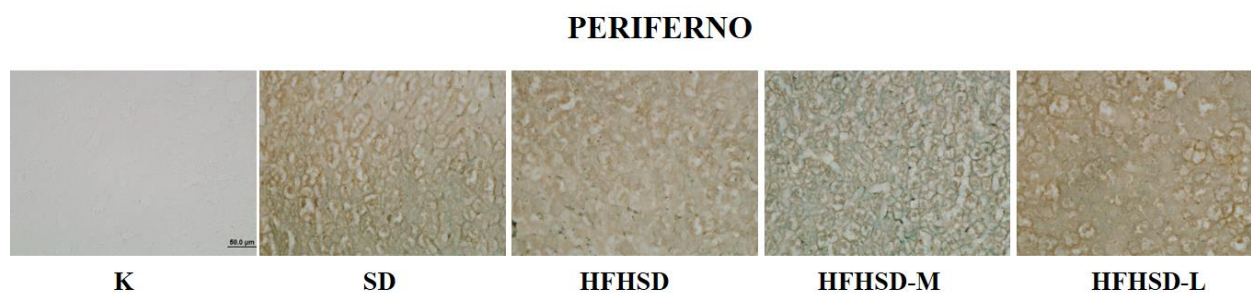
Slika 2. Razlike u količini nakupljenog željeza dobivene Pearls-DAB tehnikom u 4 skupine životinja u strukturi SN. Mann-Whitney U test i T-test za nezavisne uzorke. * statistička značajnost <0.05; ** statistička značajnost <0.005; ***statistička značajnost <0.001

5.2. Nakupljanje željeza u stanicama jetre periferno i centralno kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima

Intenzitet obojenja histološkog željeza u periferno u jetri ne slijedi, dok centralno u jetri slijedi normalnu distribuciju. Količina željeza periferno u jetri podjednaka je u 3 skupine životinja: SD, HFHSD i HFHSD-L, no treba napomenuti da HFHSD-L životinje imaju najveću međusobnu varijabilnost. HFHSD-M životinje imaju značajno sniženje u odnosu na sve ostale skupine ($p < 0.001$) (Slike 3 i 4).

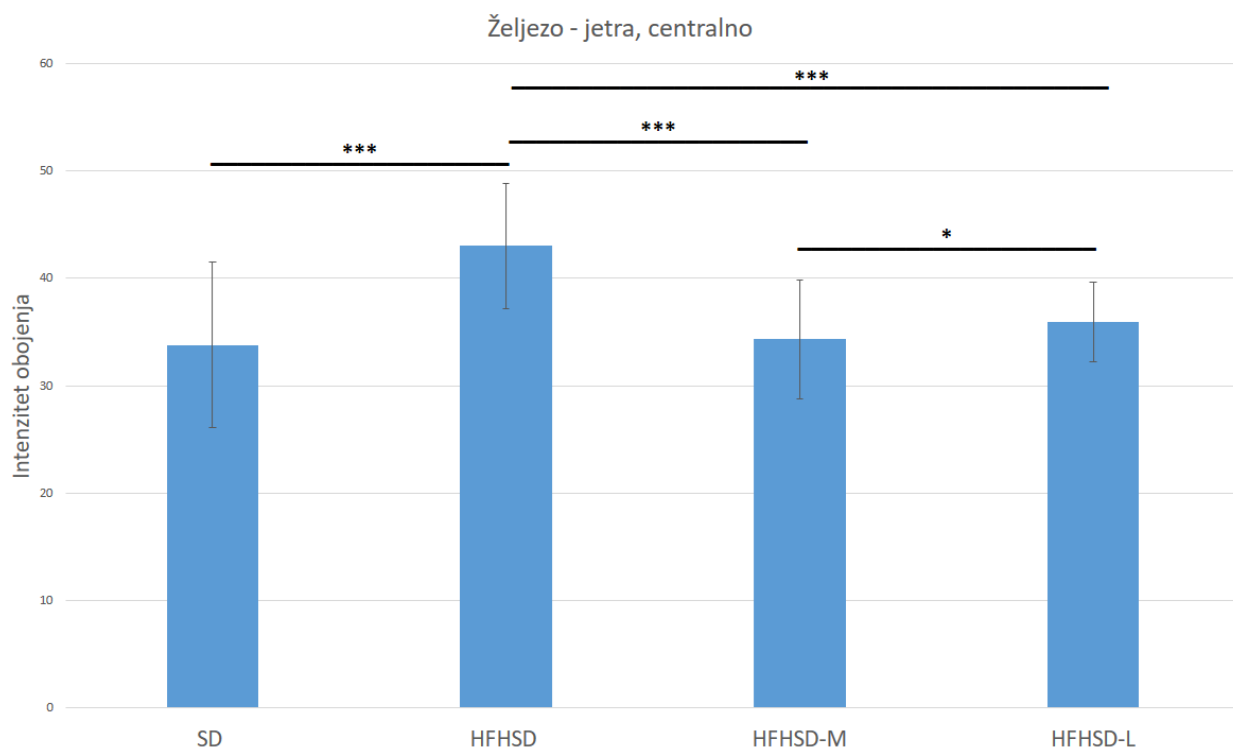


Slika 3. Razlike u količini nakupljenog željeza dobivene Pearls-DAB tehnikom u 4 skupine životinja u jetri periferno. Mann-Whitney U test. * statistička značajnost <0.05; ** statistička značajnost <0.005; ***statistička značajnost <0.001

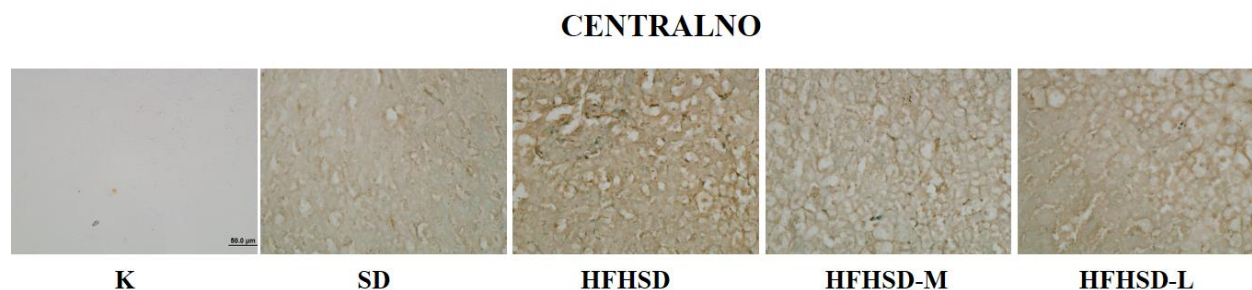


Slika 4. Prikaz rezultata histološkog bojenja Perls-DAB za dokazivanje prisutnosti željeza u jetri periferno ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50µm.

Količina željeza centralno u jetri podjednaka je u 3 skupine životinja: SD, HFHSD-M i HFHSD-L, no treba napomenuti da HFHSD životinje imaju značajno više vrijednosti od svih drugih skupina ($p < 0,001$). Također HFHSD-L ima značajno više vrijednosti od HFHSD-M ($p < 0,05$), ali su te obje vrijednosti bliske SD vrijednostima (Slike 5 i 6).



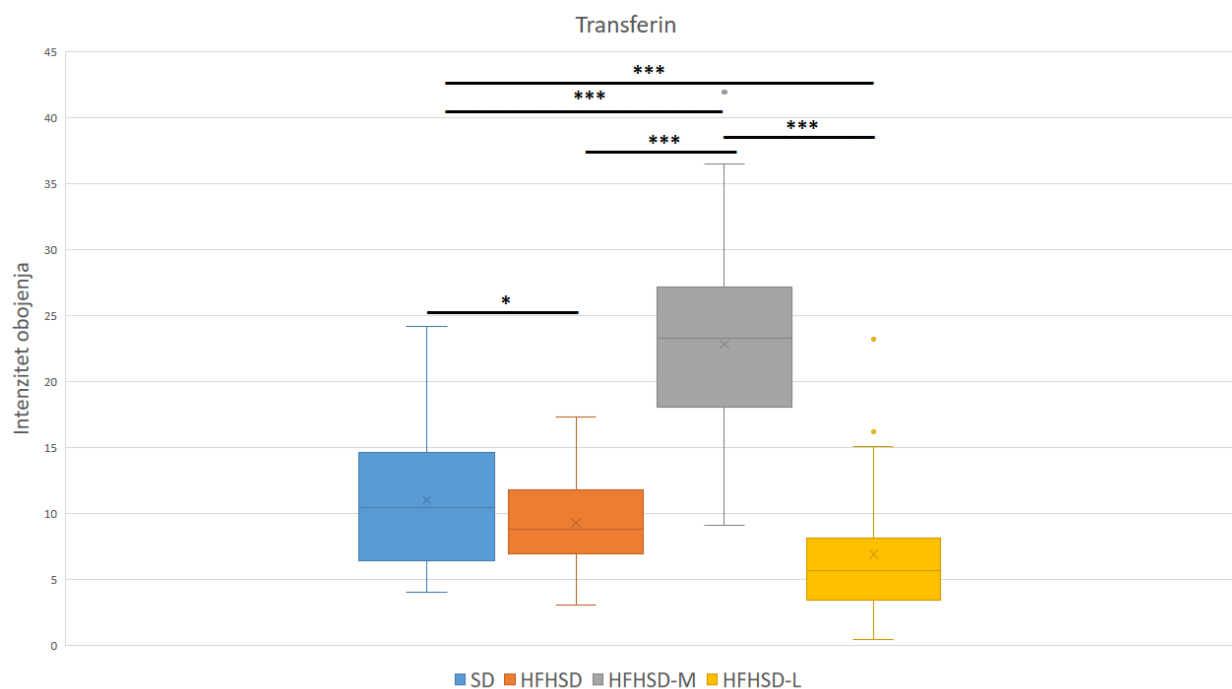
Slika 5. Razlike u količini nakupljenog željeza dobivene Pearls-DAB tehnikom u 4 skupine životinja u jetri centralno. T-test za nezavisne uzorke. * statistička značajnost < 0.05 ; ** statistička značajnost < 0.005 ; *** statistička značajnost < 0.001



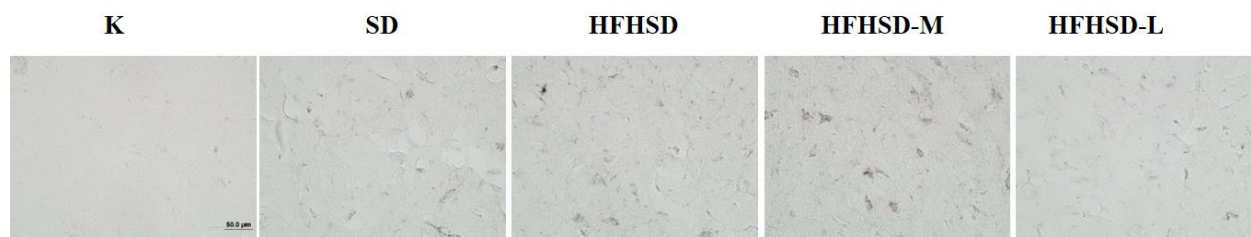
Slika 6. Prikaz rezultata histološkog bojenja Perls-DAB za dokazivanje prisutnosti željeza u jetri centralno ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50 μ m.

5.3. Ekspresija transferinskih receptora u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidijetivima

Ekspresija transferinskih receptora u mozgu u slijedi normalnu distribuciju u slučaju usporedbe SD skupine sa skupinama HFHSD, HFHSD-M i HFHSD-L. Kod usporedbe HFHSD-M skupine sa HFHSD skupinom nije primijećena normalna distribucija. Najmanja ekspresija je u HFHSD-L životinja. HFHSD životinje imaju značajan pad transferina u odnosu na SD ($p < 0,05$), a HFHSD-M imaju rast u odnosu na SD i HFHSD ($p < 0,001$) (Slike 7 i 8).



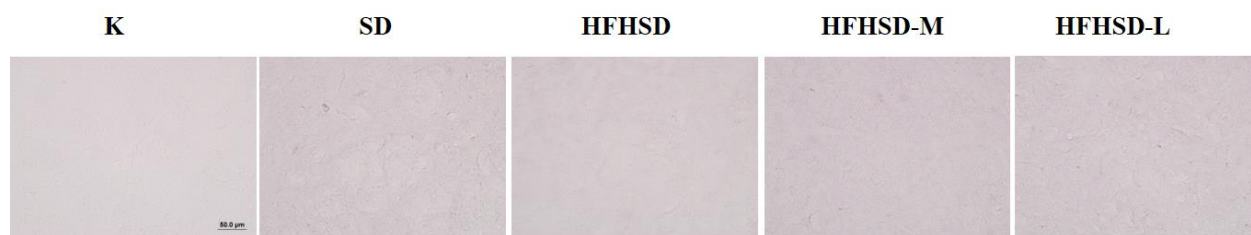
Slika 7. Razlike u ekspresiji transferinskih receptora dobivene imunohistokemijskom metodom u 4 skupine životinja u strukturi SN. Mann-Whitney U test i T-test za nezavisne uzorke. * statistička značajnost < 0.05 ; ** statistička značajnost < 0.005 ; *** statistička značajnost < 0.001



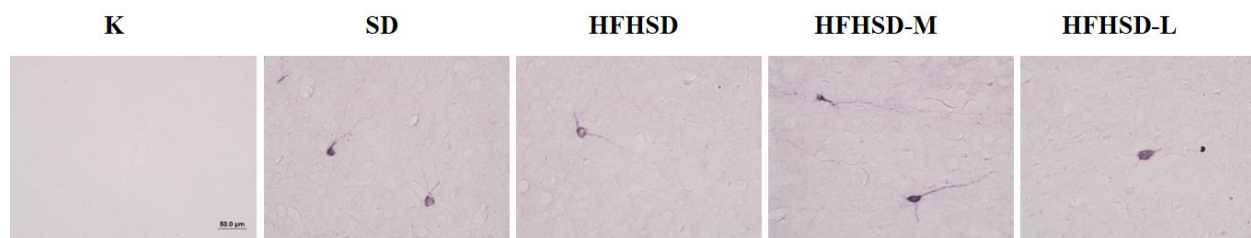
Slika 8. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja za dokazivanje prisutnosti transferinskih receptora u strukturi SN ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50μm.

5.4. Ekspresija nNOS u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima

Prilikom ispitivanja štakora na nNOS pokazalo se da nema imunopozitivnih stanica u SN regiji mozga (Slika 9). Valjanost protutijela na nNOS potvrđena je u hipokampusu mozga gdje se mogu vidjeti imunopozitivne stanice (Slika 10).



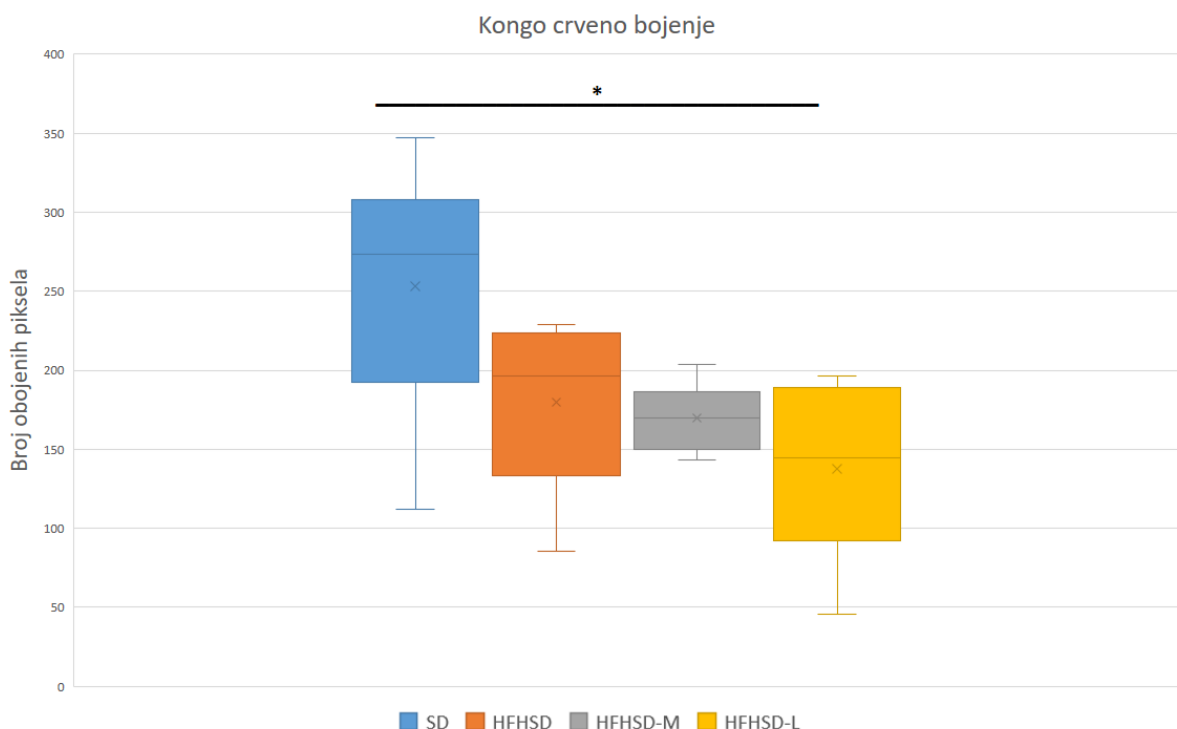
Slika 9. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja za dokazivanje prisutnosti nNOS u strukturi SN ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50μm.



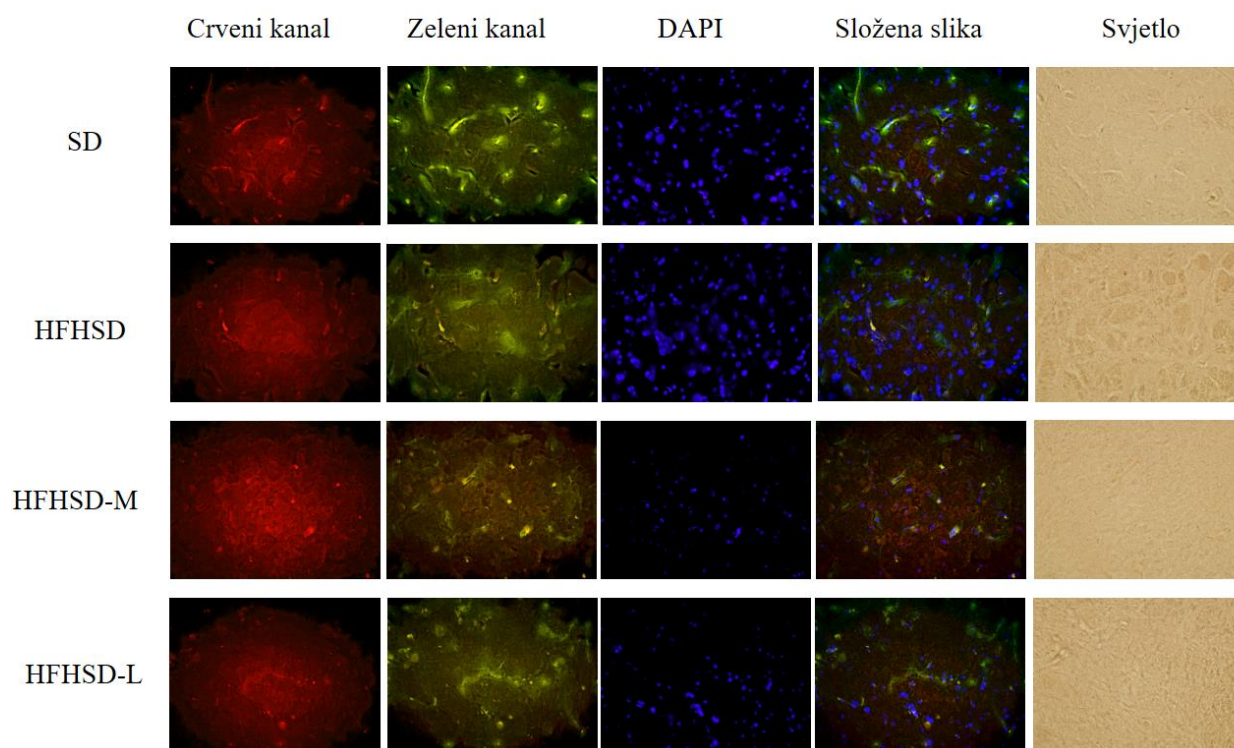
Slika 10. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja za dokazivanje prisutnosti nNOS u hipokampusu ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50μm.

5.5. Nakupljanje amiloida u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima

Količina amiloida u mozgu štakora ne slijedi normalnu distribuciju. Statistički značajna razlika u količini amiloidnih plakova postoji samo između SD i HFHSD-L skupine ($p < 0,05$) s tim da SD skupina pokazuje veće obojenje (Slike 11 i 12).



Slika 11. Razlike u količini amiloida dobivene histološkom metodom Kongo crvenog bojenja u 4 skupine životinja u strukturi SN. Mann-Whitney U test. * statistička značajnost < 0.05 ; ** statistička značajnost < 0.005 ; ***statistička značajnost < 0.001



Slika 12. Prikaz rezultata histološkog bojenja Kongo crvenog za dokazivanje prisutnosti amiloida u strukturi SN ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x.

5.6. Nakupljanje pTau u stanicama SN kod ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima

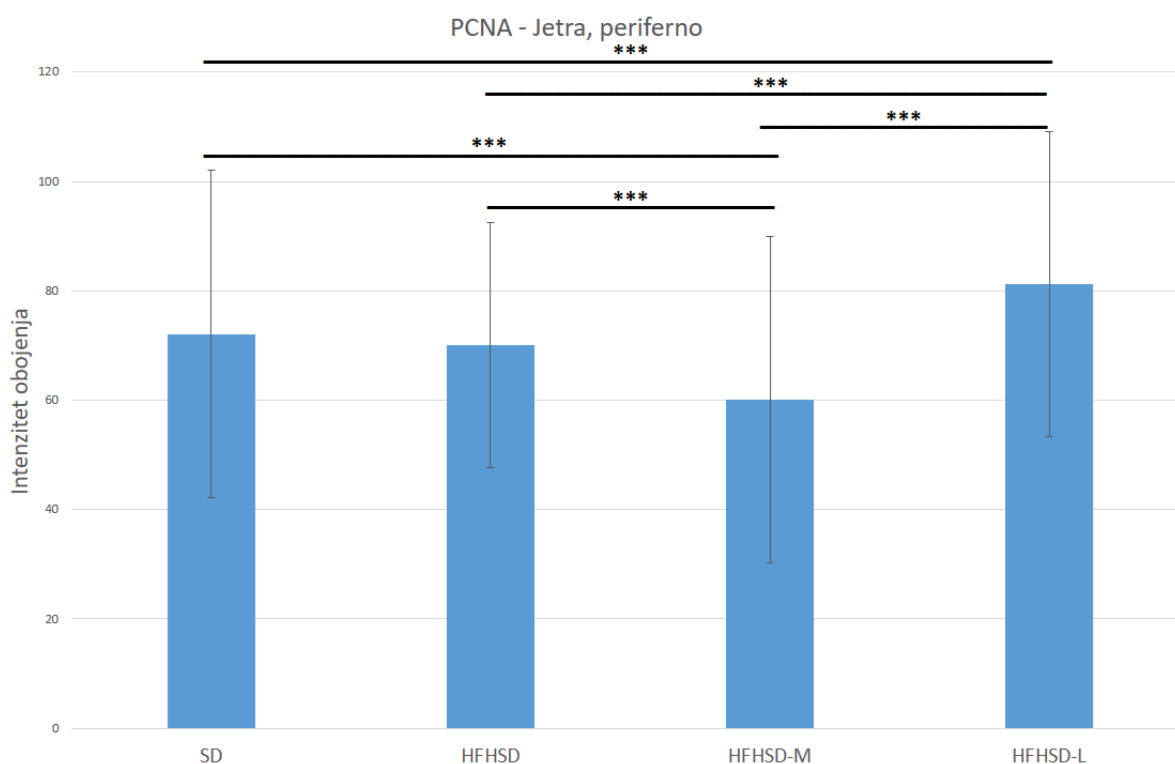
Intenzitet obojenja proteina pTau statistički značajno se ne razlikuje između 4 skupine štakora (Slika 13).



Slika 13. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja za dokazivanje prisutnosti pTau agregata u strukturi SN ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50µm.

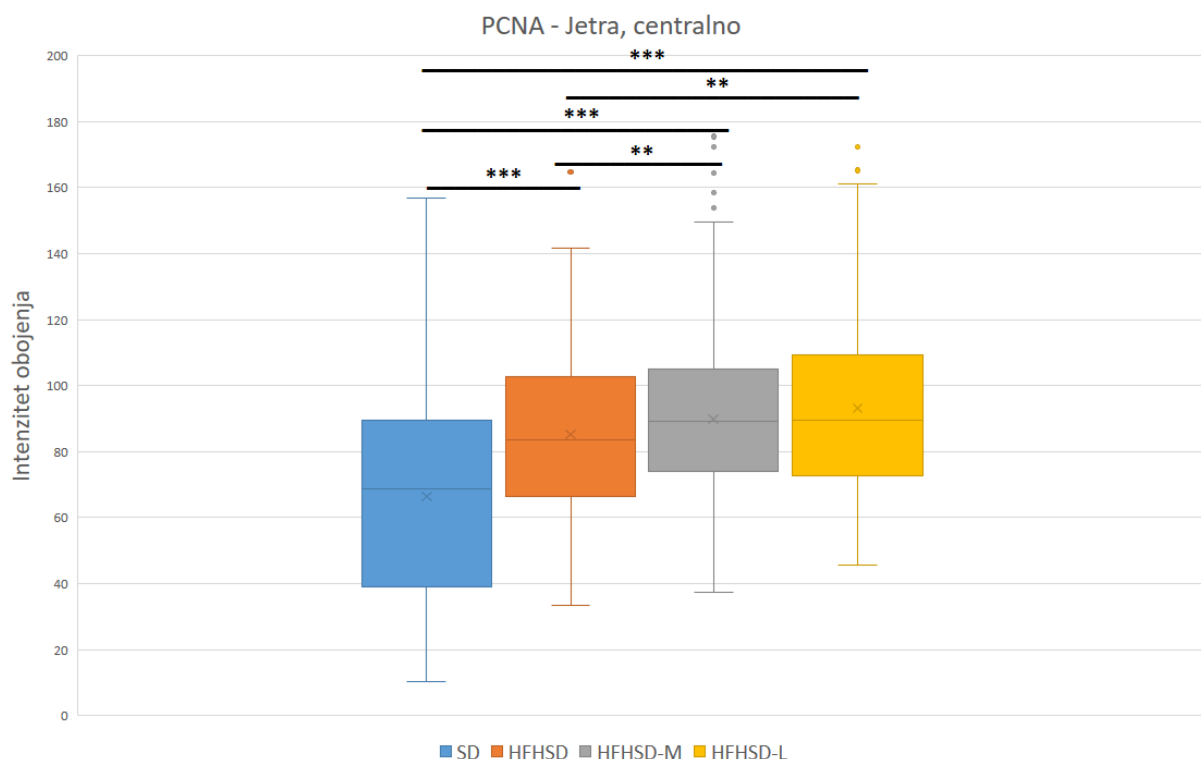
5.7. Ekspresija PCNA u stanicama jetre periferno i centralno kod ženki izloženih HFHSD i antidijetivima

Intenzitet obojenja jezgri kao marker ekspresije antigena PCNA periferno u jetri pokazuje normalnu distribuciju. Centralno u jetri normalna distribucija postoji kod usporedbe HFHSD skupine sa HFHSD-M i HFHSD-L skupinama. Normalna distribucija nije primijećena kod usporedbe SD skupine s ostalim trima skupinama štakora. U jetri periferno HFHSD-L skupina ima najveće vrijednosti u odnosu na sve ostale skupine ($p < 0,001$). HFHSD-M skupina ima najniže vrijednosti u odnosu na sve ostale skupine ($p < 0,001$) (Slike 14 i 16).



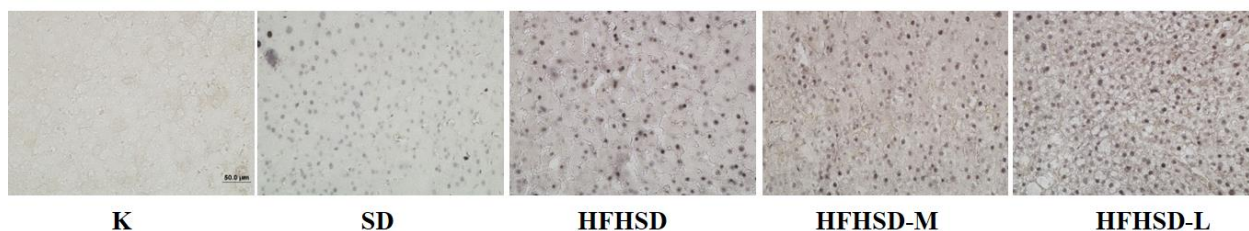
Slika 14.. Razlike u ekspresiji PCNA dobivene imunokemijskom metodom u 4 skupine životinja u jetri periferno. T-test za nezavisne uzorke. * statistička značajnost < 0.05 ; ** statistička značajnost < 0.005 ; *** statistička značajnost < 0.001

Kao i periferno, centralno u jetri HFHSD-L imaju najviše vrijednosti od svih skupina, a razlika je značajna u svih skupina osim u HFHSD-M (SD $p < 0,001$, HFHSD $p < 0,05$) (Slike 15 i 17).



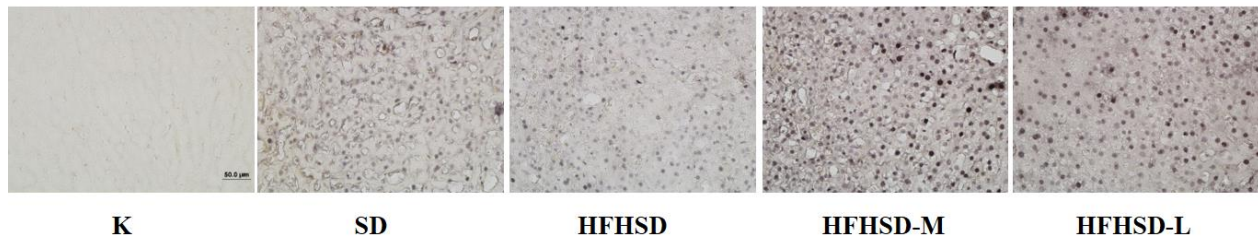
Slika 15. Razlike u ekspresiji PCNA dobivene imunokemijskom metodom u 4 skupine životinja u jetri centralno. Mann-Whitney U test i T-test za nezavisne uzorke. * statistička značajnost < 0.05 ; ** statistička značajnost < 0.005 ; *** statistička značajnost < 0.001

PERIFERNO



Slika 16. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja za dokazivanje prisutnosti PCNA u jetri periferno ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50µm.

CENTRALNO



Slika 17. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja za dokazivanje prisutnosti PCNA u jetri centralno ženki izloženih HFHSD i antidijabeticima. Povećanje 400x, veličina skale 50μm.

6. RASPRAVA

Ženke Sprague Dawley štakora koje su korištene u ovom istraživanju pokazivale su metaboličke promjene karakteristične za predijabetičko stanje (prema GTT testu). Dijabetes tipa II je bolest koja može biti uzrokovana prekomjernom tjelesnom težinom i pretilošću (6). Predijabetes je stanje koje prethodi dijabetesu, a karakterizira ga smanjena osjetljivost tkiva na inzulin. Razine inzulina i glukoze u krvi mijenjaju se ovisno o kojem stadiju predijabetesa se radi. U početku je razina glukoze normalna zbog kompenzacije inzulinom, ali je razina inzulina povišena. Kasnije kompenzatorni mehanizam inzulina slabi pa razine glukoze mogu biti normalne ili povišene, a kada se kompenzatorni mehanizam inzulina potpuno iscrpi razine glukoze rastu, a inzulina padaju (2).

Histološkim bojenjem željeza Perlsovom metodom pokazalo se da u centralnom dijelu jetre najviše željeza ima HFHSD skupina (Slika 5). U stanju pretilosti, koje je ujedno i kronično upalno stanje, šalju se signali za pohranu željeza u tkiva, a svrha im je oksidirati suvišak glukoze i masti koji stižu prehranom (7). Ostale skupine imaju podjednake zalihe željeza (Slika 5). Povećana količina željeza HFHSD skupine u odnosu na SD skupinu ukazuje na to da debljanje dovodi do skladištenja željeza. Skupine na masnoj i slatkoj prehrani tretirane antidijabeticima imaju podjednake količine uskladištenog željeza slične kao SD skupina što govori o pozitivnom učinku antidijabetika. U jetri periferno u lobulima najmanje željeza ima HFHSD-M dok ostale skupine imaju podjednako željeza (Slika 3). HFHSD-L imaju najveću međusobnu varijabilnost možda baš uslijed djelovanja lijeka. Periferno u jetri promjene nastaju s određenim odstupanjem za razliku od centralnog dijela zbog slabije prokrvljenosti periferije. Možemo pretpostaviti da metformin ima povoljnije djelovanje od liraglutida s obzirom da se na periferiji uočava sniženje željeza kod HFHSD-M skupine.

Rezultati bojenja željeza u mozgu Perlsovom metodom su pokazali kako HFHSD prehrana ne povećava zalihe željeza u SN regiji mozga, ali zato antidijabetici itekako povećavaju. Očekivano je da HFHSD skupina ima najveće zalihe željeza no dogodilo se upravo suprotno – HFHSD skupina ima najmanje zalihe željeza, dok HFHSD-L ima najviše. HFHSD-M skupina ima nešto manje željeza od HFHSD-L (Slika 2). Očekivanja su temeljena na istraživanjima koja su pravljena uglavnom na mužjacima dok je ovo istraživanje spolno specifično i bazirano na ženkama. Uzrok povećanju zaliha željeza u HFHSD-M može biti djelovanja estradiola. Estradiol ima brojne funkcije u tijelu, a neke od njih su i smanjivanje upale. Smanjivanjem upale smanjuje se i

nakupljanje željeza u tkivu (54). Primijećeno je kako metformin utječe na smanjenje razine estrogena što umanjuje protuupalni učinak i može objasniti nakupljanje željeza u nekim tkivima. Ipak, na X kromosomu ima mnoštvo gena koje mušjaci na Y kromosomu nemaju stoga je limitirano sve razlike muškaka i ženki objašnjavati estrogenom (55). Liraglutid ima nešto drugačije djelovanje od metformina te je naglašen njegov anorektični učinak. Naime, liraglutid pojačava osjećaj sitosti i usporava pražnjenje želuca što vjerojatno postiže otpuštanjem dopamina (56). Dopamin je u većoj količini štetan ako se nalazi unutar stanice, a nije akumuliran u sinaptičkim vezikulama. Kako bi se spriječilo njegovo štetno djelovanje on se pregrađuje u neuromelanin, pigment koji veže željezo da spriječi oksidativni stres. Isto tako vezanje željeza u neuromelanin sprječava da željezo oksidira dopamin u toksične spojeve. Nakupljanje većih količina neuromelanina dovodi do neurodegenerativnih promjena (57). Poznato je da hrana izaziva poplavu dopamina koja dovodi do euforije pa tako i hrana može izazvati ovisnost. Čestim i prekomjernim unosom hrane neuroni su bombardirani dopaminom te kako bi se zaštitili od štetnog djelovanja dopamina nakon nekog vremena smanjuju ekspresiju dopaminskih receptora i ulazak dopamina (56). Neuromelanin ostaje nakupljen u stanici iako je ulazak dopamina kasnije smanjen. S obzirom da neuromelanin veže željezo to bi objasnilo zašto HFHSD-L skupina ima najveće zalihe željeza.

Razlika u zalihama željeza u jetri i mozgu HFHSD-L skupine postoji zbog mehanizma djelovanja antidijabetika. Liraglutid utječe na neuromelanin u mozgu koji u jetri ne postoji stoga nema pojačanog nakupljanja željeza. Objašnjenje za sniženje željeza centralno u jetri HFHSD-M skupine u odnosu na HFHSD skupinu još nemamo pa bi valjalo napraviti i bojenje na transferinski receptor kako bismo ispitali je li sniženje željeza kod HFHSD-M povezano sa sniženjem ekspresije transferinskih receptora.

Imunohistokemijskim bojenjem mjerili smo ekspresiju transferinskih receptora u mozgu u regiji SN. Najmanja ekspresija transferinskih receptora zabilježena je u HFHSD-L životinja (Slika 7) i ovo je obrnuto od očekivanja jer u ostale 3 skupine ekspresija transferina slijedi isti trend kao i skladištenje željeza (Slika 2). Transferin je protein koji željezo doprema unutar stanice stoga je za očekivati da u stanju upale imamo povećanu količinu željeza u stanici uslijed povećane ekspresiju transferinskih receptora na površini stanice – što bi bilo tipično za stanje predijabetesa u kojem se nalaze naše životinje (12). Iako je opisano kako veća ekspresija transferinskih receptora nužno ne podrazumijeva i veći unos željeza u stanice (13), teško je povjerovati da je slučajnost da

u skupinama s velikim zalihama željeza imamo i veću ekspresiju transferinskih receptora. Stoga je logično pretpostaviti da se u slučaju HFHSD-L skupine dogodilo razdvajanje do tada međusobno ovisnih procesa – unosa željeza i veličine njegovog skladišta.

Ekspresija nNOS mjerena je imunohistokemijskim bojanjem SN regije mozga. Pokazalo se da u SN regiji nema nNOS imunopozitivnih stanica. Neuralnu NOS treba kvantificirati u drugim regijama mozga, primjerice u hipokampusu koji ima posebno istraživana svojstva plastičnosti, ali to nije tema ovog završnog rada.

Kongo crvenim bojenjem pokušali smo prikazati nakupine amiloida. HFHSD-L skupina imala je najmanje piksela žutog tonaliteta što bi ukazivalo i na najmanju količinu amiloida, dok je SD skupina imala najviše takvih piksela. Ovo bojenje je odraz metabolizma SN stanica i tu se zapravo radi od autofluorescenciji monoamina, a ne o amiloidnim plakovima stoga treba napraviti imunohistokemijsko bojenje protutijelima na amiloid kako bi se izbjegli lažno pozitivni i lažno negativni rezultati radi autofluorescencije mozga.

Fosforilacijom Tau proteina postiže se njegova funkcija vezanja na mikrotubule (25,26). U slučaju hiperinzulinemije dolazi do hiperfosforilacije što djeluje potpuno suprotno – smanjuje se afinitet vezanja za mikrotubule pa se od nevezanog Tau stvaraju agregati (27, 28). Tau agregati, isto kao i agregati amiloida sudjeluju u patogenezi Alzheimerove bolesti. Postoji razlika između amiloida u dijabetesu i Alzheimeru, ali smatra se da koriste iste šaperone za svoje smatanje pa su oni moguća poveznica dijabetesa i Alzheimerove bolesti (35). Imunohistokemijskim bojenjem pTau proteina nisu dobiveni statistički značajni rezultati vezano za razlike između pojedinih skupina. Očekivani rezultat bio bi povećana količina pTau agregata kod HFHSD skupine zbog hiperinzulinemije no ta pretpostavka je temeljena na istraživanjima koja su pravljena uglavnom na mušjacima. Naša studija rađena je isključivo na ženama stoga rezultati nisu u potpunosti usporedivi. U budućim istraživanjima valjalo bi ispitati nakupljanje pTau u regijama u kojima počinju prve promjene fosforilacije Tau te se iz njih šire u druge regije. Fosforilacija počinje u entorinalnoj regiji i prvo se širi u hipokampus (58), stoga bi te regije bile prve koje treba istražiti. Isto tako treba ispitati postojanje drugih izoformi pTau u ciljnim regijama mozga te usporediti ukupnu količinu Tau proteina u mozgu s količinom u pojedinoj populaciji stanica. Postoje druge metode vizualizacije osim imunohistokemije koje treba uzeti u obzir, poput imunofluorescencije i Western blota.

PCNA je marker regeneracije i ukazuje na oštećenje koje se pokušava popraviti (36). Radili smo imunohistokemijsko bojenje periferno i centralno u jetri na antigen PCNA. HFHSD-M ima najmanju ekspresiju PCNA u perifernom dijelu lobula što ukazuje na najmanje oštećenje jetre u odnosu na ostale skupine (Slika 14). Treba naglasiti da HFHSD-M imaju i najmanje zalihe željeza periferno u jetri (Slika 3). Suprotno tome, drugi antidiijabetik (liraglutid) ima najveću ekspresiju antigena PCNA u periferiji (Slika 14), ali zalihe željeza mu se ne razlikuju u značajnoj mjeri od HFHSD i SD skupina. Možemo primijetiti da ekspresija antigena PCNA i zalihe željeza ne koreliraju. HFHSD-L i centralno u jetri ima najveću ekspresiju antigena PCNA. SD skupina centralno ima najmanju ekspresiju što je i u skladu s očekivanjima jer se smatra da skupina na standardnoj prehrani ne bi trebala imati oštećenja jetre. HFHSD pokazuje veću ekspresiju od SD skupine što znači da već i samo debljanje dovodi do oštećenja centralnog dijela lobula (Slika 15). Jetre bi valjalo obojati Sudan Black i Oil Red bojama kako bi se ovaj rezultat doveo u korelaciju s masnom degeneracijom jetre do koje dolazi u pretilosti i predijabetesu. Treba pretpostaviti da do nakupljanja masti prvo dolazi centralno, a zatim periferno u lobulima te da metformin možda ima povoljniji učinak na jetru od liraglutida.

Ne postoji jednostavno objašnjenje svih naših rezultata i u nekim slučajevima su se rezultati pokazali upravo kontradiktorni onome što se očekivalo no uvjeti raznih eksperimenata su bili različiti, s naglaskom na spol životinja. Kako bismo točno razumijeli o čemu se radi treba uspoređivati podatke koji su sakupljeni od istih životinja koje su živjele u identičnim uvjetima te ispitivati potrebne biljege na više različitih načina kako bi dobiveni podaci bili vjerni prikaz stanja u organizmu, bez lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

7. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati dovode do sljedećih zaključaka:

1. U jetri dolazi do većeg nakupljanja željeza i ekspresije antigena PCNA kod ženki Sprague Dawley štakora koje su bile na prehrani obogaćenoj mastima i šećerima u odnosu na životinje na standardnoj prehrani. Antidiijabetik metformin smanjio je zalihe željeza i oštećenje jetre u odnosu na životinje na obogaćenoj prehrani, a liraglutid je smanjio zalihe željeza, no ne i oštećenje jetre.
2. U regiji mozga *substantia nigra* ne dolazi do povećanog nakupljanja željeza kod životinja na obogaćenoj prehrani u odnosu na skupinu na standardnoj prehrani, a antidiijabetici su povećali zalihe željeza kod životinja na obogaćenoj prehrani. Povećanje zaliha željeza prati povećanje ekspresije transferinskih receptora kod svih skupina osim one na obogaćenoj prehrani tretirane liraglutidom.
3. Histološkom bojom Kongo crvenom dobiveni su lažno pozitivni rezultati na amiloid, a imunohistokemijom na pTau i nNOS nisu dobiveni statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

8. SAŽETAK

Uvod: Pretilost je rizični faktor za razvoj dijabetesa tipa II. Dijabetes je bolest koju karakterizira hiperglikemija, rezistencije na inzulin te kronična upala. Sukladno tome u organizmu se mijenja metabolizam željeza u jetri i mozgu te dolazi do oštećenja tkiva. Pomoću predijabetičkih životinja moguće je pratiti patofiziološke promjene te utjecaj lijekova na njih.

Ciljevi: U 4 skupine životinja koje su na 1. standardnoj dijeti (SD), 2. dijeti obogaćenoj mastima i šećerima (HFHSD), 3. obogaćenoj dijeti, a potom tretirani antidijabeticima metforminom (HFHSD-M) i 4. liraglutidom (HFHSD-L) procijeniti sadržaj željeza u jetri i regiji *substantia nigra* (SN) bojenjem Perlsovom metodom, a u SN regiji imunohistokemijom na transferinski receptor. Imunohistokemijski procijeniti regenerativnu sposobnost jetre. Kongo crvenom procijeniti količinu amiloida u SN regiji, a imunohistokemijski količinu neurofibrilarnih snopova.

Materijali i metode: U studiju su uključene 32 ženke Sprague Dawley štakora podijeljene u 4 skupine: 1. SD, 2. HFHSD, 3. HFHSD-M i 4. HFHSD-L. Histološkim bojenjima Perlsovom metodom i Kongo crvenom obojani su željezo i amloid. Imunohistokemijski, pomoću protutijela na transferinski receptor, fosforilirani Tau (pTau), neuralnu nitrid oksid sintazu (nNOS) i jezgrin proliferirajući antigen (PCNA) detektirani su pripadajući biljezi.

Rezultati: Postoji statistički značajna razlika rezultata bojenja na željezo te PCNA antigena, dok u slučaju pTau, nNOS te Kongo bojenja nije utvrđena statistički značajna razlika. Antidijabetici metformin i liraglutid djelomično su uspjeli pokazati svoje terapijske učinke.

Zaključak: U predijabetesu dolazi do poremećaja metabolizma željeza u jetri i mozgu te oštećenja tkiva.

Ključne riječi: dijabetes; željezo; jetra; SN regija.

9. SUMMARY

Introduction: Obesity is the risk factor for the development of type II diabetes. Diabetes is a disease characterized by hyperglycemia, insulin resistance and chronic inflammation. Accordingly, the metabolism of iron in the liver and brain changes in the body and tissue damage occurs. Using pre-diabetic animals, it is possible to monitor the pathophysiological changes and the effect of the drugs on them.

Goals: In 4 groups of animals on the 1. standard diet (SD), 2. diet enriched with fats and sugars (HFHSD), 3. enriched diet and then treated with antidiabetic metformin (HFHSD-M) and 4. liraglutide (HFHSD-L) to evaluate the iron content in the liver and region of *substantia nigra* (SN) by using the Perls method, and in the SN region by immunohistochemical localization of the transferrin receptor. Immunohistochemically evaluate regenerative liver function. To evaluate the amount of amyloid in the SN region using histological color Congo red, and the number of neurofibrillary bundles immunohistochemically.

Materials and methods: The study included 32 female Sprague Dawley rats divided into 4 groups: 1. SD, 2. HFHSD, 3. HFHSD-M and 4. HFHSD-L. With histological staining Perls method and Congo red we detected iron and amyloid. Immunohistochemically, using transferrin receptor antibodies, phosphorylated Tau (pTau), neural nitric oxide synthase (nNOS), and core proliferating antigen (PCNA), respective markers were detected.

Results: There is a statistically significant difference between iron staining results and PCNA antigen, while in the case of pTau, nNOS and Congo staining, no statistically significant difference was found. The antidiabetics metformin and liraglutide have partially managed to show their therapeutic effects.

Conclusion: In the pre-diabetes, disorders of iron metabolism in the liver and brain and tissue damage occur.

Keywords: diabetes; iron; liver; SN region.

10. LITERATURA

1. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR Jr, Silventoinen K. Comparison of Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist/Hip Ratio in Predicting Incident Diabetes: A Meta-Analysis. *Epidemiol Rev.* 2007;29:115–128.
2. Beck-Nielsen H, Groop LC. Metabolic and Genetic Characterization of Prediabetic States: Sequence of Events Leading to Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Invest.* 1994; 94:1714-1721.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2014; 37 (S1):81-90.
4. Hostalek U, Gwilt M, Hildemann S. Therapeutic Use of Metformin in Prediabetes and Diabetes Prevention. *Drugs.* 2015;75:1071–1094.
5. Kroner Z. The Relationship between Alzheimer's Disease and Diabetes: Type 3 Diabetes? *Altern Med Rev.* 2009; 14(4):373-9.
6. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 2016; 10;23(5):770-84.
7. Becker C, Orozco M, Solomon NW, Schümann K. Iron metabolism in obesity: How interaction between homoeostatic mechanisms can interfere with their original purpose. Part I: Underlying homoeostatic mechanisms of energy storage and iron metabolisms and their interaction. *J Trace Elem Med Biol.* 2014;30:202–206.
8. Pickup JC. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27:813–823.
9. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MBH. Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases? *J Neurochem.* 1994; 63, (3):793-807.
10. Guoa S, Frazer DM, Anderson GJ. Iron homeostasis: transport, metabolism, and regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016;19:000–000.

11. Fernandez-Real JM, McClain D, Manco M. Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38:2169–2176.
12. Tortorella S, Karagiannis TC. Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy. *J Membrane Biol*. 2014;247:291–307.
13. Hill JM, Rufft MR, Weber RJ, Pert CB. Transferrin receptors in rat brain: Neuropeptide-like pattern and relationship to iron distribution. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; Volume 82:4553-4557.
14. Thorstensen K, Romslo I. The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. *Biochem J*. 1990;271:1-10.
15. Ward D, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1426–1433.
16. Abo Zeid AA, El Saka MH, Abdalfattah AA, Zineldeen DH. Potential factors contributing to poor iron status with obesity. *Alexandria Journal of Medicine*. 2014;50:45–48.
17. Nikonorov AA, Skalnaya MG, Tinkov AA, Skalny AV. Mutual interaction between iron homeostasis and obesity pathogenesis. *J Trace Elem Med Biol*. 215;30:207–214.
18. Pietrangelo A. Iron and the liver. *Liver Int*. 2016;36(S1):116–123.
19. Yamamoto K, Kuragano T, Kimura T, Nanami M, Hasuike Y, Nakanishi T. Interplay of adipocyte and hepatocyte: Leptin upregulates hepcidin. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;495:1548-1554.
20. Hubler MJ, Peterson KR, Hasty AH. Iron homeostasis: a new job for macrophages in adipose tissue? *Trends Endocrinol Metab*. 2015; 26 (2):101-109.
21. Castillo J, Rodriguez I. Biochemical Changes and Inflammatory Response as Markers for Brain Ischaemia: Molecular Markers of Diagnostic Utility and Prognosis in Human Clinical Practice. *Cerebrovasc Dis* 2004;17(Suppl 1):7–18.
22. Goto R, Doi M, Ma N, Semba R, Uji Y. Contribution of Nitric Oxide-Producing Cells in Normal and Diabetic Rat Retina. *Jpn J Ophthalmol*. 2005;49:363–370.

23. Mastrocola R, Restivo F, Vercellinatto I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, i sur. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *Journal of Endocrinology*. 2005;187:37–44.
24. Dawson TM, Snyder SH. Gases as Biological Messengers: Nitric Oxide and Carbon Monoxide in the Brain. *J Neurosci*. 1994;14(9): 5147-5159.
25. Johnson GVW, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*. 2004;117:5721-5729.
26. Lesort M, Johnson GVW. Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. *Neuroscience*. 2000; 99, (2):305–316.
27. Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, i sur. The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun*. 2011;252:1-9
28. Hong M, Lee VMY. Insulin and Insulin-like Growth Factor-1 Regulate Tau Phosphorylation in Cultured Human Neurons. *J Biol Chem*. 1997; 272(31): 19547–19553.
29. Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased Tau Phosphorylation and Cleavage in Mouse Models of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Endocrinology*. 2009;150(12):5294–5301.
30. Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. *Brain research review*. 2007;56:384-402.
31. Biessels GJ, Kappelle LJ. Increased risk of Alzheimer’s disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochemical Society Transactions*. 2005; 33, (5):1041-1044.
32. Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, i sur. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *The FASEB Journal*. 2004; 18:902-904.

33. Oskarsson ME, Hermansson E, Wang Y, Welsh N, Presto J, Johansson J, i sur. BRICHOS domain of Bri2 inhibits islet amyloid polypeptide (IAPP) fibril formation and toxicity in human beta cells. *Cell biology*. 2018; 115(12):E2752–E2761.
34. Pithadia A, Brender JR, Fierke CA, Ramamoorthy A. Inhibition of IAPP Aggregation and Toxicity by Natural Products and Derivatives. *J Diabetes Res*. 2015;2016:2046327.
35. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O’Brien P, Petersen RC, Butle PC. Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease. *Diabetes*. 2004; 53:474-481.
36. Theocharis SE, Skopelitou AS, Margeli AP, Pavlaki KJ, Kitras C. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Expression in Regenerating Rat Liver After Partial Hepatectomy. *Dig Dis Sci*. 1994; 39 (2):245-252.
37. Ojanguren I, Ariza A, Llatjos M, Castella E, Mate JL, Navas-Palacios JJ. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, regenerative, and neoplastic liver: A fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol*. 1993;24(8):905-8.
38. Greig SL, Scott LJ. Insulin Degludec/Liraglutide: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs*. 2015;75:1523–1534.
39. Potts JE, Gray LJ, Brady EM, Khunti K, Davies MJ, Bodicoat DH. The Effect of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists on Weight Loss in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Mixed Treatment Comparison Meta-Analysis. *Plos One*. 2015;10(6):e0126769.
40. Ladenheim EE. Liraglutide and obesity: a review of the data so far. *Drug Des Devel The*. 2015;9:1867–1875.
41. Ford RJ, Fullerton MD, Pinkosky SL, Day EA, Scott JW, Oakhill JS, i sur. Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. *Biochem J*. 2015;468:125–132.
42. Pernicova I, Korbonits M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:143-156.

43. Cho YM, Kieffer TJ. New aspects of an old drug: metformin as a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) enhancer and sensitiser. *Diabetologia*. 2011;54:219–222.
44. Emmerzaal TL, Kiliaan AJ, Gustafson DR. 2003-2013: A Decade of Body Mass Index, Alzheimer's Disease, and Dementia. *J Alzheimers Dis*. 2015;43:739–755.
45. Taylor R. Type 2 Diabetes: Etiology and reversibility. *Diabetes Care*. 2013; 36:1047-1055.
46. Domingueti CP, Dusse LMS, Carvalho MG, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP, i sur. Diabetes Mellitus: The Linkage Between Oxidative Stress, Inflammation, Hypercoagulability and Vascular Complications. *J Diabetes Complications*. 2015;30(4):738-45.
47. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;Chapter 5;5.61.1-5.61.18.
48. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 2016;5(1):11-21.
49. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res*. 1999;848(1-2):114-23.
50. Underwood EL, Thompson LT. A High-Fat Diet Causes Impairment in Hippocampal Memory and Sex-Dependent Alterations in Peripheral Metabolism. *Neural Plast*. 2015;2016:7385314
51. De Olmos J, Hardy H, Heimer L. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol*. 1978;181:213–44.
52. Clement CG, Truong LD. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. Department of Pathology and Genomic Medicine. 2014;45(8):1766-72.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ljiljana Majić

Datum i mjesto rođenja: 28. siječnja 1997., Vinkovci

Adresa stanovanja: Matije Gupca 59, 32284 Stari Mikanovci

Kontakt: 095/918-1879

E-mail: majic.ljilja79@gmail.com

Obrazovanje:

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Opća gimnazija, Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci

2003. – 2011. Osnovna škola Stjepana Cvrkovića u Starim Mikanovcima